

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E. A. P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Algunas propiedades catalíticas de la L-aminoácido
oxidasa del veneno de la serpiente Bothrops atrox
"jergón"**

TESIS

para optar al título profesional de Biólogo con Mención en Biología Celular
y Genética

AUTORA

Nora Cecilia Ruiz Guevara

Lima-Perú

2009

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

A mis Padres Nora y Germán: su amor, ejemplo, y confianza me inspiraron y apoyaron para realizar este trabajo, el que como fruto les entrego.

A mi hermana Natalia, espejo y mejor amiga, por seguir pintando flores en este jarrón.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Armando Yarlequé, Jefe del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, por su asesoramiento, continuo apoyo, dedicación, y facilidades proporcionadas para el desarrollo de la presente tesis, así como por las enseñanzas y experiencias compartidas en el laboratorio que dirige.

A mis maestros en el Laboratorio de Biología Molecular por sus enseñanzas y consejos durante mi aprendizaje: al Blgo. Orestes Málaga mi primer profesor en la Facultad, a la Mg. Edith Rodríguez por la evaluación del presente trabajo, y mi especial agradecimiento a la Mg. Fanny Lazo, por su dedicación al adiestrarme con esmero y paciencia en el estudio de la L-aminoácido oxidasa, así como por sus oportunas correcciones, y sugerencias a lo largo de este trabajo.

A mis compañeros y mentores en el Laboratorio, por encaminarme y ser ejemplo de dedicación: al Mg. Gustavo Sandoval, muy especialmente, por su invaluable ayuda, orientación, críticas y sugerencias durante la realización y evaluación de este trabajo y a la Blga. Rosío Inga, por su continuo apoyo. A mis compañeros: Blgo. Dan Vivas, Bach. Julio Mendoza, Srta. Susan Medina y Sr. Edgar González por siempre estar dispuestos a brindar su apoyo, y por su alegre camaradería. A todos ellos, mi sincero reconocimiento y afecto.

Al Mg. Christian Solís Calero, miembro del proyecto CONCYTEC en el que se enmarca esta investigación, por su orientación y colaboración.

Finalmente, al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) por el financiamiento de la presente investigación a través del proyecto PROCYT 2006 “Análisis bioinformático y experimental de moléculas inhibidoras de la enzima L-aminoácido oxidasa de venenos de serpientes del género *Bothrops*” desarrollado en el Laboratorio de Biología Molecular de la UNMSM.

CONTENIDO

	Pág.
Resumen	1
Summary	2
Introducción	3
Antecedentes	7
Material y Métodos	11
Resultados	18
Discusión	21
Conclusiones	29
Referencias Bibliográficas	30
Tablas y Figuras	38

ABREVIATURAS

CM-Sephadex C-50	Carboximetil Sephadex C-50
EDTA	Ácido etilen diamino tetra acético
kDa	Kilodaltons
LAO	L-Aminoácido oxidasa
mg	Miligramo
NaCl	Cloruro de sodio
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
Rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TEMED	N,N,N,N'- tetrametiletilendiamino
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
μg	Microgramo
K_m	Constante de Michaelis
V_{max}	Velocidad máxima
K_i	Constante de inhibición
K_{cat}	Constante catalítica
K_m/K_{cat}	Eficiencia catalítica

RESUMEN

Se purificó la enzima L-aminoácido oxidasa (LAO) del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* "Jergón" y se determinaron sus propiedades cinéticas. La LAO fue purificada mediante dos pasos cromatográficos, una columna de filtración molecular empleando Sephadex G-75 y otra de intercambio catiónico con CM-Sephadex C-50. La enzima tuvo un peso molecular de 54.6 kDa calculado por PAGE-SDS. Entre los sustratos ensayados a pH 8.5, la LAO presentó mayor actividad específica sobre L-fenilalanina, y luego sobre L-leucina, L-metionina y L-arginina, estando su actividad máxima en un rango de pH de 6.9 a 9.6. Para cada sustrato se determinaron los valores de pH óptimo obteniéndose 8.1 con L-metionina, 8.9 con L-arginina, y 8.2 con L-fenilalanina. Para estos aminoácidos, se determinaron los parámetros cinéticos de K_m , V_{max} , K_{cat} y K_{cat}/K_m a pH 7.5 y 8.5. De acuerdo a la eficiencia catalítica, la L-leucina fue el mejor sustrato a pH 8.5 ($K_{cat}/k_m = 71.213 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$) y a 7.5 ($K_{cat}/k_m = 40.903 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$). Asimismo se evaluó la inhibición enzimática a pH 8.5 utilizando ácido antranílico, ácido benzoico, ácido salicílico y ácido sulfanílico, determinándose el modelo de inhibición y los valores de K_i . Se encontró que el ácido antranílico tuvo el menor valor de K_i (0.0082 mM), ajustándose al modelo de inhibición no competitiva, el ácido benzoico fue considerado un inhibidor competitivo y los ácidos salicílico y sulfanílico fueron inhibidores de tipo mixto.

Palabras claves: L-aminoácido oxidasa, *Bothrops atrox*, parámetros cinéticos, inhibición enzimática, K_i .

SUMMARY

An L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* venom was purified and its kinetic properties determined. Purification procedure was carried out through two chromatography steps: a size exclusion chromatography on Sephadex G-75, followed by an ion exchange chromatography on CM-Sephadex C-50. This enzyme had a molecular weight of 54.6 kDa calculated by SDS-PAGE. Between substrates assayed to pH 8.5, LAO had higher specific activity on L-phenylalanine followed by L-leucine, L-metionine and L-arginine. These were in a range of pH 6.9 to 9.6 being optimum values of 8.1 for L-metionine, 8.9 for L-arginine, and 8.2 for L-phenylalanine. Kinetics parameters (K_m , V_{max} , K_{cat} and K_{cat}/K_m) for these L-amino acids were determined at pH 7.5 and 8.5. According to catalytic efficiency, we found that L-leucine was the best substrate at pH 7.5 ($K_{cat}/k_m = 40.903 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$) and 8.5 ($K_{cat}/k_m = 71.213 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$). By the way, we evaluated enzyme inhibition at pH 8.5 using anthranilic, benzoic, salicylic and sulphonylic acid, determining the best model of enzyme inhibition as well as K_i values. The minimal K_i value was for anthranilic acid ($K_i = 0.0082 \text{ mM}$), fitting it to a non-competitive model. Benzoic acid was considered a competitive inhibitor, while salicylic and sulphonylic acid showed mixed-type inhibition.

Key words: L-amino acid oxidase, *Bothrops atrox*, kinetics parameters, enzyme, K_i

INTRODUCCIÓN

En el mundo existen aproximadamente 3000 especies de serpientes, de ellas apenas 410 son consideradas venenosas y son clasificadas de acuerdo a sus características morfológicas en 4 familias: Viperidae, Elapidae, Colubridae y Crotalidae (Barraviera, 1994). Estas últimas se caracterizan por tener una ponzoña compuesta de sustancias de acción tóxica y enzimática, cuya proporción y características específicas varía entre las diferentes especies conocidas (Tu, 1977).

El veneno de las serpientes es considerado una mezcla de toxinas, enzimas y péptidos, los cuales inducen diversos efectos en sus víctimas. Su función primaria es la captura de sus presas; sin embargo, puede ser usado como defensa, causando daños severos a sus agresores, entre ellos los seres humanos (Amaral, 1977). En el caso de las serpientes de la familia Viperidae, su composición es más compleja que la de otras familias, pues contienen un gran número de proteínas bioquímica y farmacológicamente activas (Dalpai y Santo Neto, 1994). Por otro lado contienen componentes no proteicos los que pueden dividirse en orgánicos e inorgánicos como son aminoácidos libres, nucleótidos, carbohidratos, lípidos, aminas biogénicas, aniones y cationes (Barraviera y Pereira, 1999).

Debido a su composición, los venenos de serpiente han sido objeto de numerosos estudios, los cuales tienen como objetivo: 1) aislar una o más sustancias activas del veneno, que en bajas concentraciones puedan presentar efectos farmacológicos de gran interés para el desarrollo de medicamentos; 2) tener una mejor comprensión de la función de las sustancias aisladas del veneno de serpientes en el proceso del envenenamiento; y 3) verificar si existe algún principio activo, sintético o natural que pueda inhibir la acción del veneno y de algunas proteínas aisladas del mismo.

En el Perú existe una fauna ofídica muy variada habiéndose reportado hasta la fecha 47 especies de serpientes venenosas, de las cuales 24 pertenecen al

género *Bothrops*. Entre ellas se destaca la especie *Bothrops atrox*, perteneciente a la familia Viperidae. Morfológicamente, esta serpiente se caracteriza por poseer la cabeza en forma de punta de lanza, exhibir en el dorso un patrón ornamental consistente de bloques rectangulares o trapezoidales, y un color que varía entre olivo, pardo, canela y gris. Puede alcanzar un tamaño de 2.4 m y se alimenta principalmente de pequeñas presas, entre ellas roedores y lagartijas (Carrillo, e Icochea 1995).

La mortalidad causada por especies botrópicas a nivel mundial se estima en 2.4%, lo que puede llegar al 8% si el paciente no es tratado debidamente (WHO, 1981). En nuestro país, el 90% de accidentes ofídicos son causados por la especie terrestre *Bothrops atrox*, constituyendo un problema de salud pública muy importante (Loja *et al.*, 2000).

Con respecto al veneno de *Bothrops atrox*, podemos decir que su acción es principalmente local, comprendiendo hemorragia, edema y mionecrosis, en tanto que su acción sistémica es hipotensora, proteolítica y coagulante. Esto fue verificado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, estableciéndose que los principales componentes bioactivos aislados de esta serpiente presentan actividad proteolítica, esterásica, fibrinolítica, kininogenásica (Loayza *et al.*, 1985; Pantigoso *et al.*, 1996), fosfolipásica, 5' nucleotidasa (Heredia, 1982), de enzima similar a trombina (Orejuela *et al.*, 1991) y miotóxica (Huatuco, 2004), las que son responsables de los síntomas clínicos del envenenamiento.

Dentro de los principales componentes del veneno de *B. atrox*, encontramos a la L-aminoácido oxidasa o LAO (EC 1.4.3.2). Esta enzima es una flavoproteína responsable del color amarillo de los venenos y es específica para la desaminación oxidativa de un L-aminoácido hasta un α -cetoácido con la consiguiente producción de amoníaco y peróxido de hidrógeno. En los venenos de serpiente vipéridas, las L-aminoácido oxidasas se encuentran en una proporción promedio del 4% (p/p) del total de la proteína de la ponzoña (Iwanaga y Suzuki, 1979) y su actividad usualmente es más elevada que en los venenos de elápidos (Mebs, 1970). Es por esto que los venenos de serpientes

constituyen una buena fuente para la obtención de esta enzima a fin de caracterizarla estructural y funcionalmente.

Hasta antes de 1990, el estudio de las LAO de venenos de serpientes estaba dirigido principalmente a su aislamiento, caracterización y estudio de algunas de sus propiedades enzimáticas y fisicoquímicas (Curti *et al.*, 1992), mecanismos de acción e inactivación por cambios de pH o temperatura (Porter y Bright, 1980). En los últimos años estas enzimas vienen siendo aisladas y purificadas para caracterizarlas farmacológica, estructural y molecularmente, evaluando además las diferentes actividades biológicas atribuidas a ellas tales como: inducción de la apoptosis (Suhr y Kim, 1996), inhibición e inducción de agregación plaquetaria (Takatsuka *et al.*, 2001), efecto antibacteriano (Yarlequé *et al.*, 1997) y efecto anti-VIH (Zhang *et al.*, 2003). Adicionalmente se ha resuelto la estructura tridimensional de algunas LAO por difracción de rayos X, por ejemplo las de *Calloselasma rhodostoma* (Pawelek *et al.*, 2000) y *Agkistrodon halys pallas* (Zhang *et al.*, 2004). Por estas razones, el estudio de LAO, dado sus efectos biológicos y farmacológicos comprobados, podría convertir a esta enzima en una herramienta biotecnológica y biomédica, con potencial aplicación en salud humana o en la industria.

En el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, se han aislado y caracterizado algunas L-aminoácido oxidasas, tales como la de *Lachesis muta* (Cisneros, 2006), *Bothrops brazili* (Solís *et al.*, 1999) y *Bothrops atrox* (Lazo *et al.*, 2007). En todos estos casos se ha ensayado y verificado su acción antibacteriana.

En cuanto al estudio de LAO de *Bothrops atrox*, Lazo *et al.*, (2007) aislaron y determinaron varias características bioquímicas de esta enzima, entre ellas su peso molecular, pH óptimo y determinación de azúcares asociados. Así también se determinó su acción biológica, encontrándose que presenta efecto antimicrobiano *in vitro* sobre microorganismos patógenos, efecto *in vitro* contra promastigotes de *Leishmania braziliensis braziliensis*, y contra epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, además de un marcado efecto edemático.

Dado el potencial biotecnológico de la L-aminoácido oxidasa del veneno de la serpiente de mayor interés médico en Perú, *Bothrops atrox*, es necesario evaluar sus principales propiedades cinéticas. En consecuencia, y con el fin de profundizar este estudio, el objetivo del presente trabajo fue estudiar experimentalmente la cinética enzimática de esta LAO para evaluar el efecto que tiene sobre ella, la naturaleza química de los sustratos. Así también, ensayar posibles inhibidores, evaluando el grado y la naturaleza de la interacción, para seleccionar así los mejores inhibidores candidato lo que permitirá establecer posibles mecanismos de regulación de esta enzima.

ANTECEDENTES

Las L-aminoácido oxidasas (LAOs) son flavoproteínas, descritas inicialmente por Zeller en 1977. Estas proteínas están enlazadas en forma no covalente con el cofactor FAD y están presentes en los venenos de varias especies de serpientes (Curti *et al.*, 1992). Las LAOs son enzimas que catalizan la desaminación oxidativa de un L-aminoácido hasta su correspondiente α -cetoácido con la consiguiente producción de amoníaco y peróxido de hidrógeno (Fig. N° 2).

La L-aminoácido oxidasa (EC 1.4.3.2) se encuentran ampliamente distribuídas en varios organismos, así como en los venenos de serpiente (Curti *et al.*, 1992). Esta proteína presenta una significativa similitud con la proteína inductora de interleucina-4 en ratones (Raibekas y Massey, 1998), con la monoamino oxidasa (MAO) y puede estar envuelta en la respuesta de la inflamación alérgica (Chu y Paul, 1997).

En cuanto a sus características bioquímicas tenemos que las LAOs son, por lo general, glicoproteínas homodiméricas con un peso molecular de 110 a 150 kDa aproximadamente, y de 55-66 kDa en su forma monomérica. Cada subunidad consta de tres dominios: un dominio de ligación al grupo prostético (FAD), en donde el cofactor está presente en razón de ~ 2 mol/mol, uno de ligación al substrato, y un dominio helicoidal. Se han aislado LAOs de naturaleza ácida, neutra y básica (pI 4.4-8.5); sin embargo, no se ha determinado si la diferencia de cargas afecta sus variadas propiedades farmacológicas.

Se ha reportado que esta enzima exhibe una preferencia por aminoácidos aromáticos o, de forma más general, hidrofóbicos incluyendo, fenilalanina, triptófano, tirosina y leucina. En contraste, la deaminación de aminoácidos polares y básicos se realiza a una velocidad mucho menor.

En los venenos de serpientes, la LAO está presente en altas concentraciones, representando del 1 al 9% del total de las proteínas del veneno, (Du y Clemetson, 2002) y participa secundariamente en los efectos tóxicos (Li *et al.*, 1994; Torii *et al.*, 1997). Los mejores estudios de estas flavoproteínas se han realizado en venenos de serpientes principalmente del género *Calloselasma* (Ponnudurai *et al.*, 1994; Moustafa IM *et al.*, 2006).

En relación al rol de LAO en el envenenamiento, se sugiere que el papel primario de LAO en el veneno es promover indirectamente la hipotensión a través de la liberación de H₂O₂, lo que activaría a la enzima guanilato ciclasa para producir guanidin monofosfato cíclico (cGMP), provocando que las células cardíacas disminuyan su contracción, lo que paralizaría a la presa. También se cree que esta enzima está relacionada con la inflamación alérgica asociada con células endoteliales de mamífero. Sin embargo, el mecanismo de acción de las LAOs de venenos de serpientes es aún incierto ya que de forma general, estas enzimas son multifuncionales. En este aspecto, Sakurai *et al.*, (2003) presentaron resultados interesantes con la LAO aislada del veneno de *Agkistrodon halys blomhoffii*, donde la enzima actúa como un anticoagulante inhibiendo selectivamente al factor IX de la cascada de coagulación.

Por otro lado se describen amplios efectos biológicos y farmacológicos para esta enzima, entre ellos la inducción de apoptosis, (Torii *et al.*, 1997; Masuda *et al.*, 1997; Suhr y Kim, 1996), citotoxicidad (Souza *et al.*, 1999; Ahn *et al.*, 1997), inducción o inhibición de la agregación plaquetaria (Li *et al.*, 1994), hemorragia (Sakurai *et al.*, 2003), hemólisis (Abe *et al.*, 1998), edema (Tan y Choy, 1994), efectos bactericidas (Stiles *et al.*, 1991) y leishmanicidas (Tempone *et al.*, 2001).

Recientemente se aisló una LAO del veneno de la serpiente *Crotalus durissus cascavella* (Toyama *et al.*, 2006), que presenta actividad leishmanicida muy eficiente, y también inducción de la agregación plaquetaria y acción bactericida. Para la LAO aislada del veneno de *Vipera berus berus*, (Samel *et al.*, 2006) se comprobó que induce agregación plaquetaria e induce apoptosis debido a la fragmentación del ADN. Por otra parte, Zhang *et al.*, (2003) trabajaron en la

caracterización molecular de la LAO aislada del veneno de *Trimeresurus stejnegeri* (TSV-LAO) y también fueron los pioneros en los estudios relacionados con la actividad antiviral, encontrándose que la TSV-LAO presenta acción anti-VIH.

Respecto al género *Bothrops*, se ha reportado diversa actividad biológica de las LAOs de varias especies sudamericanas, como *B. moojeni* con efecto anti-*Leishmania* (Tempone *et al.*, 2001), *B. alternatus* con efecto bactericida (Stabeli *et al.*, 2004), *B. pirajai* con actividad bactericida y antitumoral (Izidoro *et al.*, 2006), *B. jararaca* con efecto antiviral y antiparasitario (Sant'Ana, C, *et al.*; 2008), y *B. insularis*, causante de necrosis tubular aguda. (Braga, MD, *et al.*, 2008) .

Numerosas investigaciones han determinado la estructura tridimensional de las LAOs, su secuencia N-terminal y la secuencia de sus cDNA respectivos (Takatsuka *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003; Macheroux *et al.*, 2001). A partir del análisis filogenético, se ha reportado que las LAOs presentan una gran similitud en su secuencia N-terminal, donde por ejemplo, la LAO aislada del veneno de *Agkistrodon halys blomhoffii* presenta un 90% de similitud con la de la LAO del veneno de *C. atrox* (Torii *et al.*, 2000) y 88% con la de *C. adamanteus* (Raibekas y Massey, 1998). Sin embargo, hasta el momento, solamente se ha reconstruido la estructura tridimensional por cristalografía para las LAOs aisladas del veneno de *C. rodhostoma* (Pawelek *et al.*, 2000) y del veneno de *Agkistrodon halys pallas* (Zhang *et al.*, 2004).

En cuanto a la L-aminoácido oxidasa de *B. atrox*, Lazo *et al.*, (2007), determinaron que la enzima es una glicoproteína ácida formada por dos cadenas polipeptídicas, las cuales presentan al menos un puente disulfuro intracatenario con un peso molecular de 63.12 kDa. Esta enzima tiene un 17% de carbohidratos asociados, pierde actividad en presencia de Zn^{2+} (6mM) y tolera temperaturas hasta los 55°C. Los ensayos de inmunodifusión e inmunoelectroforesis con antiveneno botrópico polivalente demostraron que es una proteína antigénica. En cuanto a su acción biológica, LAO presentó acción bactericida contra Gram positivos y Gram negativos, un efecto *in vitro* contra

promastigotes de *Leishmania braziliensis braziliensis* y contra epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Además, produjo un severo edema al ser inyectada en cojinetes plantares de ratones albinos, lo que constituye una evidencia de su participación en procesos inflamatorios.

Las LAOs están revelando cada vez más efectos biológicos, demostrando el gran potencial de estas proteínas para su uso en la industria y medicina. Por esta razón los estudios de caracterización estructural y funcional de esta clase de enzimas son muy importantes, tanto desde el punto de vista de la comprensión de su mecanismo de acción, como a su potencial aplicación biotecnológica en el campo médico y farmacéutico.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material Biológico

Se utilizó veneno crudo de ejemplares adultos de la serpiente *Bothrops atrox*, procedentes de la zona de Pucallpa, mantenidos en cautiverio en el serpentario Oswaldo Meneses del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. El veneno fue extraído por presión manual de las glándulas, después liofilizado y conservado a 4 °C hasta su empleo.

2. Reactivos

Substratos y enzima:

L-leucina, L-metionina, L-arginina, L-fenilalanina (MC & B), O-dianisidina y peroxidasa de rabanito (Sigma Chemical Co).

Soluciones amortiguadoras:

Tris-HCl 0.2 M pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 y 9.5 (Sigma Chemical Co.)

Acetato de amonio 0.05 M pH 6.0; 0.2 M pH 5.0, 5.5, 6.0, y 6.5 (Riedel).

Glicina-NaOH 0.2 M pH 10.0 y 10.5 (Matheson & Coleman).

Geles para cromatografía:

Sephadex G-75 y CM Sephadex C-50 (Sigma Chemical Co).

Reactivos para la determinación de proteínas:

Reactivo de Folin Ciocalteu y albúmina sérica bovina (Sigma Chemical Co).

Inhibidores de la actividad enzimática:

Ácido salicílico, ácido sulfanílico (de E. Merk A.G), ácido benzoico y ácido antranílico. (Sigma Chemical Co).

3. Material de laboratorio y equipos

Material de vidrio

- Probetas graduadas de 10, 100 y 250 ml.
- Fioles de 50 y 100 ml.
- Beakers de 50, 100 y 250 ml.
- Tubos de ensayo (13x100).
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 ml.
- Pipetas automáticas de 5-10 µl, de 20-200 µl y de 1 ml.

Equipos:

- Espectrofómetro Shimadzu UV.120.02
- Potenciómetro digital Orion Research 611
- Baño de Temperatura regulable
- Equipo para cromatografía en columna
- Colector automático de fracciones LKB-Pharmacia
- Balanza analítica Ainsworth tipo 10N
- Cámara para Electroforesis Minislab
- Fuente de poder Duostat-Beckman

4. Cuantificación de proteínas

- 4.1 Método de Lowry: Se empleó el método colorimétrico descrito por Lowry *et al.*, (1951), modificado por Loayza *et al.*, (1985). Todos los ensayos de cuantificación del contenido proteico del veneno crudo y de las fracciones purificadas fueron realizados empleando este método. Para ello se mezcló 0.1 ml de la muestra en estudio con 0.4 ml de agua destilada y 2 ml de la solución alcalina (carbonato de sodio al 4%, sulfato de cobre al 2% y tartrato de sodio y potasio al 4% en proporciones de 100:1:1), incubándose a 37 °C por 15 minutos. Luego, se añadió 0.5 ml del reactivo Folin Ciocalteus (1:6) y se mantuvo a temperatura ambiente por 30 minutos. Se realizaron tres replicas de cada muestra. Finalmente

se midió la absorbancia a 660 nm, determinándose la concentración de proteína con respecto a un estándar de albúmina sérica bovina.

- 4.2 Método de absorción de luz ultravioleta: Este método se basa en la propiedad que tienen los anillos aromáticos de algunos aminoácidos como el triptófano de absorber la luz UV, (Warburg y Christian, 1941). El contenido proteico fue estimado midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 120-02.

5. Actividad de L-aminoácido oxidasa

Se determino por el método descrito en el Worthington Enzyme Manual (1977 y 1993) con las modificaciones de Tan *et al.*, (1986). En 2.9 ml de buffer Tris HCl 0.2M pH 7.5 conteniendo L-leucina 0.1% y O-dianisidina 0.0065%, se agregaron 10 µl de peroxidasa al 0.001%. La mezcla se preincubó durante 5 minutos a 37 °C y luego se agregaron 20µl de la solución de enzima o veneno crudo, determinándose el incremento de absorbancia a 436 nm. La actividad enzimática fue expresada en µmoles de L-leucina oxidados por minuto. En tanto que la actividad específica se expresó en Unidades/miligramo de proteína. Una unidad de actividad corresponde a la oxidación de 1µmol de L - leucina por minuto.

Para dicho cálculo se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades/mg} = \frac{\Delta A_{436}/\text{min} \times 3.0 \times \text{dilución de enzima}}{8.1 \times 0.02 \times (\text{mg/ml})}$$

en donde:

$\Delta A_{436}/\text{min}$	=	incremento en la absorbancia a 436 nm/min
3.0	=	longitud de la celda (cm)
8.1	=	coeficiente de extinción molar del FAD
0.02	=	mililitros de la solución de enzima.

Del mismo modo, se evaluó la actividad de LAO con los siguientes sustratos L-aminoácidos: ácido glutámico, ácido aspártico, treonina, serina, triptófano, valina, lisina, histidina, fenilalanina, leucina, arginina y metionina

6. Purificación de la enzima

Preparación de la muestra: 100 mg del veneno crudo de *Bothrops atrox* se resuspendieron en 1 ml de acetato de amonio 0.05 M pH 6.0, centrifugándose luego a 4000 rpm durante 10 minutos a fin de eliminar los restos insolubles.

Cromatografía en Sephadex G-75:

El sobrenadante obtenido, fue aplicado a una columna de filtración de Sephadex G-75 (66 x 1.5 cm), utilizándose para lavar la columna el buffer acetato de amonio 0,05 M pH 6,0. El ensayo cromatográfico se realizó a temperatura ambiente a una velocidad de flujo de 14 ml/h, colectándose fracciones de 2.0 ml con ayuda de un colector automático LKB-Pharmacia. En cada fracción se determinó la cantidad de proteína y la actividad enzimática, para luego juntar las fracciones con mayor actividad y colocarlas en una bolsa de diálisis para concentrarlas.

Cromatografía en CM Sephadex C-50:

Las fracciones obtenidas y concentradas en el paso anterior fueron aplicadas a una columna de intercambio catiónico de CM Sephadex C-50 (33.5 x 1.2 cm), equilibrada con el mismo buffer. Se colectaron fracciones de 1 ml a una velocidad de flujo de 16 ml/h. Posteriormente se añadió 0.4 M de NaCl al mismo buffer y se eluyeron fracciones, luego de lo cual se agregó 1M de NaCl al mismo buffer y se colectó en una probeta. En cada fracción se determinó la cantidad de proteína y la actividad enzimática para luego juntar las fracciones con mayor actividad específica, conservarlas a 4 °C y evaluar su pureza.

7. Evaluación de la pureza y peso molecular

El pool de enzima previamente purificada, fue sometido al análisis electroforético, usando geles PAGE-SDS en presencia y ausencia de 2-

mercaptoetanol, de acuerdo al método de Laemmli, (1970) para determinar su pureza así como su peso molecular. Para ello se prepararon los siguientes reactivos:

- Stock de Acrilamida al 30%
- Amortiguador del Gel de Resolución (Tris 1.5M, pH 8.8).
- Amortiguador del Gel Compactador (Tris 1.0M, pH 6.8).
- Amortiguador de la Cámara (Tris-Glicina pH 8.3)
- Solución SDS 10%.
- Persulfato de Amonio al 10%.
- Tetrametiletiléndiamina (TEMED).
- Amortiguador de muestras no Reductor (Solución concentrada 2x: Tris pH 6.8, SDS 4%)
- Amortiguador de muestras Reductor (Solución concentrada 2x: Tris pH 6.8, SDS 4%, 2-Mercaptoetanol 5%).
- Fijador (Metanol 50%, 7% Acido Acético)
- Colorante Coomassie Blue R-250.
- Solución Decolorante (Metanol 20%, Etanol 10%, Acido Acético 5%).
- Isobutanol.
- búffer de muestra: Tris HCl 0.06M, SDS 0.05%, glicerol 10% (v/v), mercaptoetanol 10% (w/v) y azul de bromofenol 0.05% (w/v).

Preparación del gel de resolución: Se mezclaron 1.52 ml de agua destilada, 1.36 ml de la solución acrilamida: bis-acrilamida 30%, 1.8 ml del buffer de gel de resolución, 5 µl de TEMED y 20 µl de persulfato de amonio 10 mg/ml. Esta mezcla se aplicó a una cámara de electroforesis vertical minislab y se dejó gelificar durante 20 minutos.

Preparación del gel de stacking: Se mezclaron 1.4 ml de agua destilada, 0.330 ml de la solución acrilamida: bis-acrilamida 30%, 0.250 ml del buffer de gel de stacking, 20 µl de TEMED y 20 µl de persulfato de amonio 10 mg/ml. Esta mezcla se aplicó sobre el gel de resolución y se dejó gelificar durante 15 minutos.

Preparación de la muestra: 14 de la enzima (8 µg de proteína) fueron tratados bajo dos condiciones: En un caso, mezclando con 6 µl de buffer de muestra reductor y en otro, con 6 µl de buffer de muestra no reductor. Ambas muestras fueron calentadas a 100 °C por 5 minutos, luego de lo cual se aplicaron a los pocillos del gel.

Marcadores de Peso Molecular: Fosforilasa B (97 KDa), Seroalbúmina bovina (66 KDa), Ovoalbumina (45 KDa), inhibidor de tripsina de soya (30 KDa), anhidrasa carbónica (20 KDa) y lisozima (14.4 KDa) cada proteína a una concentración de 2 mg/ml.

Condiciones de corrida: La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 V durante una hora con la ayuda de una fuente de poder Duostat Beckman.

Tinción y decoloración del gel: Luego de la corrida, se retiró el gel del molde y se colocó en una cámara de vidrio, para cubrirlo con solución de fijación por 15 minutos. Luego se retiró el fijador y añadió el colorante Coomassie Blue R-250, por una hora. Posteriormente se decoloró con varios lavados de una solución conteniendo metanol, ácido acético y agua (25:8:67).

8. Determinación del pH óptimo

Se determinó la actividad de LAO sobre L-fenilalanina, L-metionina y L-arginina según lo descrito en el Manual Worthington (1993) a distintos valores de pH. Para ello se utilizó en la mezcla de reacción buffer acetato de amonio 0.2 M a pH 5.0, 5.5, 6.0 y 6.5; buffer Tris HCl 0.2 M a pH 7, 7.5, 8.0, 8.5, 9, 9.5 y buffer glicina-NaOH 0.2 M a pH 10.0 y 10.5. El sustrato se preparó a una concentración de 7.5 mM, mientras que la concentración de O-dianisidina fue de 0.0065%. La actividad enzimática fue calculada usando 20 µl de la solución de enzima. El pH óptimo se calculó mediante el Modelo de Gauss utilizando el programa Microcal Origin versión 6.0.

9. Determinación de los parámetros cinéticos

Se determinó el comportamiento cinético de la enzima purificada en buffer Tris-HCl 0.2 M para los siguientes sustratos: L-leucina, L-metionina, L-fenilalanina y L-arginina a dos valores de pH: pH 7.5 y pH 8.5 observándose gráficamente el efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad L-aminoácido oxidasa ensayada con 20 µl de enzima o 20 µl de una dilución de enzima. La concentración de enzima utilizada fue de 6.85×10^{-9} M, la cual se calculó a partir del peso molecular de la enzima (127.87 kDa) estimado por Lazo *et al.*, (2007) expresado en g/mol y de la cantidad de proteína en gramos empleada en la reacción. El incremento en la absorbancia a 436 nm se calculó de la porción inicial linear de la velocidad.

Los parámetros cinéticos K_m y V_{max} fueron estimados según la ecuación de Michaelis-Menten ($V_o = V_{max}[S]/k_m + [S]$), mediante la representación de Michaelis Menten y Lineweaver-Burk, utilizando el software Sigmaplot versión 10.0. Los ensayos se realizaron por triplicado. También se calcularon los valores de K_{cat} y eficiencia catalítica.

10. Ensayos con inhibidores de la actividad enzimática

El ensayo anterior fue repetido con el mejor sustrato entre los ensayados, es decir, L-leucina; en presencia de ácido salicílico, ácido benzoico, ácido sulfanílico y ácido antranílico a concentraciones de entre 0.005 y 16 mM a pH 8.5. Para ello se ensayo con una batería de 4 concentraciones fijas de sustrato L-leucina (0.2, 0.5, 1, y 1.5 mM) para cada concentración de inhibidor. Se realizaron las curvas con las diversas concentraciones de inhibidor. Los ensayos se realizaron por triplicado.

En cada caso se determinó el tipo de inhibición y la constante de inhibición K_i , de acuerdo a la representación de Lineweaver-Burk (Lineweaver y Burk, 1934), utilizando el software Sigmaplot versión 10.0.

RESULTADOS

Purificación de la enzima

El primer paso cromatográfico de la purificación de LAO en Sephadex G-75, dio como resultado un perfil cromatográfico a 280 nm en el que se observan 3 picos de proteína, encontrándose la actividad de LAO en el primer pico (Fig. N°. 3). Esta actividad representa un 38.85% del total de proteína, siendo la enzima purificada 23.8 veces con un rendimiento del 80.5%.

Cuando el pool de fracciones que contienen LAO se pasó por una columna de CM-Sephadex C-50, se observaron 3 picos de absorbancia a 280 nm indicando proteínas eluidas directamente con el buffer de elución a pH 6.0, y luego se eluyeron pequeños picos al utilizar el buffer de elución conteniendo NaCl 0.4 M, (Fig. N°. 4). La actividad de LAO se obtuvo a la altura del primer pico de proteína eluido; representando el 2.14% del total de proteína, con un factor de purificación de 23.83 y un rendimiento del 51.1% (Tabla N°. 1).

Pureza y peso molecular

Mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS tanto en condiciones reductoras como no reductoras; se demostró que la fracción purificada con actividad de L-aminoácido oxidasa corresponde a una única banda homogénea. Su movilidad electroforética varía en condiciones reductoras y no reductoras, calculándose un peso de 54.6 kDa sin agente reductor, y un peso de 65.8 en condiciones reductoras. (Fig. N° 5).

Actividad sobre diferentes L-aminoácidos

Se determinó la actividad L-aminoácido oxidasa sobre varios L-aminoácidos, encontrándose la mayor actividad específica a 7.5 mM y pH 8.5, sobre los aminoácidos L-metionina, L-leucina, L-arginina y L-fenilalanina (Fig. N°. 6).

pH óptimo, pKa y pKb

La enzima L amino ácido oxidasa demostró tener acción en el rango de pH de 6.9 a 9.6. Se determinó que utilizando como sustrato L-metionina el pH óptimo fue 8.1, (6.90 pKa, 9.3 pKb) (Fig. N° 16); utilizando L-arginina, 8.9 (9.6 pKa, 8.2 pKb) (Fig. N° 15); y con L-fenilalanina 8.2 (7.4 pKa, 9.0 pKb) (Fig N° 17).

Parámetros cinéticos

Los valores de V_{max} ($\mu\text{moles/min/mg}$) y K_m (mM) obtenidos a una concentración de enzima de 6.85×10^{-9} M para L-leucina, L-fenilalanina, L-metionina y L-arginina, a pH 7.5 y 8.5 se muestran en la Tabla N° 3. Para todos los casos se observó que la enzima se ajustó al modelo de cinética michaeliana a concentraciones bajas de sustrato y también se observó inhibición por sustrato a altas concentraciones.

Los menores valores de K_m se obtuvieron a pH 8.5 para los L-aminoácidos: L-leucina, L-fenilalanina, y L-arginina, mientras que para L-metionina el menor valor de K_m se obtuvo a pH 7.5.

Los valores de K_{cat} y eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m) para dichos sustratos se muestran en la Tabla N° 4.

Modelo de inhibición y valores de K_i

La actividad de LAO fue inhibida de modo no competitivo por ácido antranílico con constante de inhibición (K_i) de 0.0082 (mM). La inhibición de LAO fue competitiva cuando se empleó ácido benzoico, con un valor de K_i de 2.2 (mM). Cuando se empleó ácido sulfanílico el modelo de inhibición fue mixto con un K_i de 3.8 (mM). Asimismo, la inhibición fue también mixta con ácido salicílico, con un K_i de 4.5 (mM). (Tabla N° 5). Se muestran los valores de R^2 , AICc y el Sy.x, en donde estos representan:

R^2 : valores altos de R^2 significan que la curva está ajustada muy cerca de los puntos de datos reales.

AICc: El modelo con el menor valor AICc es la ecuación que mejor se adapta a los datos.

Sy.x: La desviación estándar de los residuos. Incluye $n-p$ (el número de puntos de datos, menos el número de parámetros en el denominador). Aumenta de acuerdo al número de parámetros. En este sentido es superior al R^2 . El modelo (ecuación) es un ajuste perfecto si el valor de la desviación estándar es bajo.

DISCUSIÓN

Actividad sobre L-aminoácidos

En los venenos de serpientes, la especificidad del sustrato para esta enzima varía de una especie a otra (Zeller y Maritz, 1944). En la tabla N° 2, se muestran los valores de actividad específica, así como los índices de hidrofobicidad de los L-aminoácidos. El índice de hidrofobicidad es la medida de con cuanta fuerza las cadenas laterales son empujadas fuera del agua, mientras más positivo es el número, el aminoácido repelerá más fuertemente al agua. Este efecto hidrofóbico es resultado del conjunto de enlaces C-C en la cadena aminoacídica y se correlaciona muy bien en los estudios de especificidad del sustrato en proteínas. La LAO de *B. atrox* mostró preferencia por los aminoácidos apolares hidrofóbicos y polares básicos, mientras que los aminoácidos ácidos no son sustratos de la LAO de *B. atrox*. Esto nos sugiere que la cadena lateral del aminoácido debe ser apolar para que el sustrato sea más específico, ya que en el centro activo de la enzima existe una región apolar que interacciona con la cadena lateral de los aminoácidos apolares.

Estas preferencias coinciden con lo reportado en la literatura. Izidoro *et al.*, (2006) encontró valores muy similares para la LAO de *Bothrops pirajai*, donde los aminoácidos preferidos son los hidrofóbicos y de cadena larga, estableciendo el siguiente orden de preferencia: phe>tyr>trp>leu>met>lle>val>his. Asimismo, también concuerdan con los sustratos reportados para *Lachesis muta*: L-leu, L-met, L-his (Cisneros, 2006), y *Bothrops brazili*: L-leu, L-met, L-arg (Solís *et al.*, 1999).

pH óptimo

Los ensayos para establecer el pH óptimo de LAO de *B. atrox*, permitieron determinar que los valores para los sustratos preferidos son cercanos, puesto que para L-metionina la máxima actividad se registra a pH 8.1; para L-arginina a pH 8.9 y para L-fenilalanina a pH 8.2. Estos valores se asemejan al obtenido

para *B. atrox* (Lazo, *et al.*, 2007) que registraron la máxima actividad a pH 8,3 usando L-leucina como sustrato, en tanto que en el rango de pH 7.5 a 8.7 se encontró no menos del 80% de la actividad máxima.

En cuanto al rango de actividad de esta enzima observamos que para L-metionina fue mayor y presentó valores entre 6.9 a 9.3, mientras que para L-arginina de 9.6 a 8.2 y para L-fenilalanina de 7.4 a 9.0. En la mayoría de las enzimas, la curva de pH es acampanada, debido a que existen por lo menos dos grupos funcionales que se disocian en su sitio activo, para posibilitar su interacción con la molécula de sustrato. Asimismo, el valor de pH para la reacción enzimática, determina la mayor o menor eficiencia del sustrato ya que el pKa de los aminoácidos en las enzimas se encuentra bajo la influencia de su entorno inmediato y no siempre es el mismo que el pKa de los aminoácidos libres. En el caso de *Crotalus adamanteus*, LAO es activa en el rango de pH de 5.0-9.0. Estos valores tienen semejanza a los reportados para las LAOs obtenidas de *Lachesis muta* con un pH óptimo de 7.5 usando L-leucina como sustrato (Cisneros, 2006); *Bothrops brazili*, de 9.0 con L-lisina, de 8.5 usando L-leucina, L-metionina, L-fenilalanina y L-arginina, de 8.0 con L-isoleucina y de 7.5 con L-triptófano como sustrato (Solís *et al.*, 1999); *Bothrops pirajai*, en el rango de 6.0-7.4 usando L-fenilalanina y L-leucina como sustrato (Izidoro, 2006); y *Calloselasma rhodostoma*, de 9.0 usando L-leucina como sustrato (Ponnudurai *et al.*, 1994). Observándose que, el pH óptimo varía dependiendo del aminoácido usado como sustrato (Page y Van Etten, 1971).

Purificación de la enzima

Los grupos que describen metodologías para la purificación de las LAOs de veneno de serpientes, principalmente utilizaron resinas de exclusión molecular, intercambio iónico, afinidad, hidrofobicidad y HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución). Las metodologías que no utilizaron HPLC ocasionaron pérdidas en la purificación debido al empleo de múltiples pasos. Takatsuka *et al.*, (2001) inició una purificación pasando el veneno de *Agkistrodon halys blomhoffi* en una resina de intercambio iónico (DEAE-Sepharose), luego de afinidad (Heparina-Sepharosa), exclusión molecular (Sephacryl S-300),

hidrofobicidad (Fenil-Sepharosa) y otro intercambio iónico (Hidroxiapatita). Sakurai *et al.*, (2001) utilizó como primer paso filtración en una resina de exclusión molecular (Sephadex G-200), para obtener la enzima llamada K-LAO del veneno de *Naja naja kaouthi*, seguido de un intercambio iónico (Bio-Rex 70), cromatografía de afinidad (Heparina-Sepharosa) y una de hidrofobicidad (Fenil-Sepharosa). En cuanto al género *Bothrops*, Izidoro *et al.*, (2006), purificó la LAO de *B. pirajai* utilizando una resina de filtración Sephadex G-75, seguida de una columna de afinidad Benzamidina-Sepharosa, luego de lo cual empleó una columna de afinidad de fenil-sepharosa, para finalmente analizar la fracción activa por HPLC. En comparación, la presente metodología de dos pasos es un camino que podemos seguir para obtener LAO de otros venenos de serpientes. Así tenemos que la purificación de otras L-aminoácido oxidasas en venenos de serpientes peruanas involucró también el empleo de resinas de filtración molecular y de intercambio iónico; así por ejemplo, para la purificación de la LAO de *L.muta* se usó CM Sephadex C50 como primer paso y un ulterior paso en Sephadex G100 obteniendo la enzima purificada 8 veces con un rendimiento del 32.0% (Cisneros, 2006), y para la LAO de *B. brazili* fue utilizado el mismo procedimiento obteniéndose una purificación de 25.19 veces y un rendimiento de 31.04% (Solis, *et al.*, 1999).

La purificación de LAO de *B. atrox* se realizó de acuerdo a lo descrito por Lazo *et al.*, (2007), con una pequeña variante ya que en lugar de Sephadex G-100 se empleó Sephadex G-75 como se muestra en la Fig.Nº 3, seguida de un intercambio catiónico en CM-Sephadex C-50 (Fig. Nº 4), esta metodología ha permitido obtener LAO con un grado de purificación equivalente a 23.83 veces con respecto al veneno crudo, un rendimiento de 51.1% y una recuperación de proteína activa de 2.14%. Los datos encontrados son ligeramente diferentes a los reportados por Lazo *et al.*, (2007), ya que ellos obtuvieron una purificación equivalente a 12.14 veces con respecto al veneno crudo, un rendimiento de 26.4 % y una recuperación de proteína activa de 2.17 %. Sanchez y Magalhaes (1991) obtuvieron resultados similares con el veneno de *Lachesis muta muta* del Brasil, utilizando una columna de Sephadex G-100 y posteriormente un intercambio aniónico en DEAE Celulosa, dando lugar a una purificación de 11 veces y un rendimiento del 40%.

Se comprobó que la enzima L-aminoácido oxidasa con la que trabajamos en este estudio se encontraba pura, al obtener en el segundo paso, es decir usando la columna de CM Sephadex C-50, una superposición de los picos de proteína y de actividad de LAO; lo que además se demuestra al observar una sola banda proteica por PAGE-SDS (Fig. N° 5). Asimismo se trata de una proteína de alto peso molecular y una proteína ácida, cuyo punto isoeléctrico es menor de 6.

Análisis cinético

La LAO de *B. atrox* exhibió una cinética Michaeliana. La constante de Michaelis, K_m , es la concentración de sustrato a la cual V_0 es la mitad de V_{max} y generalmente es una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato o de su “especificidad de enlace”, un sustrato con buena especificidad de enlace encajará y será mantenida firmemente en el sitio activo, siendo por ello más probable que reaccione.

En la Tabla N° 3, se muestran para la L-aminoácido oxidasa de *B. atrox* los valores de K_m con L-leucina, L-metionina y L-arginina como sustratos. A pH 7.5 y 8.5, aparecen claros dos puntos: (1) la cadena lateral del aminoácido debe ser apolar para que el sustrato sea más específico, (2) la especificidad cinética es muy parecida entre todos los aminoácidos usados debido a que el grupo reactivo es común para todos ellos y por ello su orientación respecto a los grupos catalíticos de la enzima es el mismo. Esto nos sugiere que en el centro activo de la enzima existe una región apolar que interacciona con la cadena lateral de los aminoácidos apolares, debido a lo cual exhiben una mayor especificidad de enlace (valores de K_m menores). Además confirma que el grupo que reacciona con los grupos reactivos del centro activo de la enzima es el mismo para los aminoácidos usados en este trabajo y por extensión a todos ellos.

Los valores más específicos de K_m se obtuvieron a pH 8.5 (Tabla N° 3), y son resultados muy similares a los obtenidos para *Calloselasma rhodostoma*, (Ponnudurai *et al.*, 1994) en donde los valores de K_m fueron para L-phe de 0.05

mM, para L-leu de 0.63 mM, L-met de 0.24 mM, y L-arg 2.5 mM. Más aún cuando se comparan estos valores con los obtenidos para *N. naja kaouthia* (Sakurai *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 1992) y *Ophiophagus hannah* (Li *et al.*, 1994), encontramos la misma relación de menor a mayor, es decir: L-phe<L-leu<L-met<L-arg. Estos resultados muestran que las LAO de venenos de serpientes exhiben un comportamiento muy similar.

La presencia de una región apolar en el centro activo puede favorecer una mayor actividad de la enzima respecto a otras, ya que polariza no sólo el grupo catalítico sino también los enlaces susceptibles del sustrato, haciendo que ambos exhiban mayor reactividad. En cuanto a la eficiencia catalítica encontramos que el mayor valor lo exhibe L-leucina tanto a pH 8.5 como 7.5, lo cual es predecible de acuerdo a su valor de hidrofobicidad y sobretodo por su abundancia en el medio celular.

Modelos de inhibición

Se han reportado varios estudios de inhibición competitiva de la L-aminoácido oxidasa, Zeller (1948) señaló que los ácidos benzoico, salicílico, mandélico, las sulfonamidas, los ácidos sulfónicos aromáticos y los ácidos alifáticos α -aminosulfónicos, son inhibidores competitivos de la L-aminoácido oxidasa de *V. aspis*. Asimismo, De Kok *et al.*, (1968) utilizando diferentes inhibidores competitivos realizó un análisis del mecanismo de unión de los inhibidores al sitio activo de la enzima de *C. adamanteus*, observándose que los ácidos benzoicos metasustituidos fueron los inhibidores más fuertes.

Un reciente estudio comparativo molecular y estructural de *Bothrops jararacussu* y *Bothrops moojeni* muestra que tienen una alta identidad de secuencia de 83–87%, y un alto grado de similitud estructural con las regiones principales como el dominio de unión al FAD, el dominio de unión al sustrato y los dominios hélice de la LAO de *C. rhodostoma*. (Franca, S.A. *et al.*, 2007). Por lo tanto, se procedió a analizar los presentes datos de cinética de la inhibición de LAO de *B. atrox*, utilizando como modelo de comparación la LAO

de este veneno, cuya estructura cristalina está bien resuelta (Pawelek *et al.*, 2000).

La interfase entre el dominio de unión al sustrato y los dominios hélice de LAO, forman un largo canal de 25 Å similar a un túnel, que provee acceso al sitio activo, en el cual se encuentra profundamente enclaustrado el grupo prostético FAD. Las paredes del túnel contienen también residuos electropositivos y electronegativos que guían a los grupos amino y carboxilo de los sustratos L-aminoácidos. Pawelek *et al.*, (2000), describió también la estructura del complejo LAO-OAB (O-aminobenzoato), determinando que existen tres sitios de ligación, en donde la orientación de estas tres moléculas de OAB está dada por las interacciones electrostáticas del túnel. El sitio de ligación más externo se encuentra a 10 Å dentro del túnel, el segundo sitio a 5.5 Å más cerca al sitio activo, y el tercer sitio se encuentra dentro del sitio activo, cerca al anillo isoalloxazina del FAD. La superficie más cercana a los grupos carboxilo del OAB fue uniformemente positiva, mientras que la superficie más próxima a los grupos amino, predominantemente negativa.

La preferencia de aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos, indica que el anillo aromático ofrece un mejor ajuste del sustrato al sitio activo, por lo que ensayamos con un set de inhibidores con esta característica. De acuerdo a la Tabla N° 5, los ácidos antranílico, acetil salicílico, benzoico y sulfanílico, inhibieron la actividad de LAO, lo que sugiere que los grupos ácidos de los inhibidores reaccionan con la misma porción de la oxidasa es decir los ácidos carboxílicos. Estas moléculas presentan una semejanza estructural con los sustratos, poseen un grupo carboxilo cargado y un grupo hidrofóbico, el anillo bencénico; por lo que se unen a la enzima en el mismo lugar que los hacen los sustratos. Sin embargo, dichos inhibidores no presentaron el mismo modelo de inhibición. La constante de inhibidor K_i , es la concentración de inhibidor en la que el valor de V_o es un tercio de V_{max} , cuando $[S] = K_m$. El valor de K_i es comparable a K_m ya que revela el grado de afinidad de la enzima por el inhibidor.

Diversas estructuras de inhibidores sugieren que los compuestos aromáticos que tienen un grupo carboxilo o hidroxilo son capaces de inhibir a la LAO (De Kok *et al.*, 1968). La similar afinidad que presentan los ácidos grasos sustituidos y no sustituidos por la LAO, sugiere que el efecto de adicionar el componente aromático resulta comparable a incrementar el tamaño de la cadena alifática. Aún cuando no se ha establecido, es razonable suponer que la interacción entre LAO y los aminoácidos involucran tanto a los grupos amino como a los carbonilo. Del mismo modo, se esperaría que los grupos ácidos del inhibidor reaccionen en la misma porción de LAO que las porciones carboxilo de los aminoácidos. Por estas razones se cree que los inhibidores que contengan tanto el grupo básico como ácido pueden ser más efectivos que los que sólo cuenten con uno de estos. Otro factor estructural es el cofactor FAD, que tiene una importante interacción con los átomos de la proteína, siendo considerado inclusive como un dominio de ésta, por lo que se piensa que el incremento en el ambiente apolar alrededor del FAD puede perturbar su espectro de absorción, afectando así también la actividad enzimática. Además el grupo FAD de la enzima es importante para establecer interacciones con los sustratos los residuos de aminoácidos básicos tales como la histidina 461, arginina 88 y lisina 324. Esto explica la afinidad a moléculas como los ácidos benzoicos que presentan como sustituyentes característicos un grupo carboxilo, grupo también presente en los sustratos L-aminoácidos de esta enzima.

En la Tabla N° 5 se consigna que el ácido benzoico presentó inhibición competitiva, ésta debido a la resonancia del anillo bencénico que tiene áreas de baja densidad electrónica, la que pueden simular al grupo amino. Ello explicaría porque el ácido benzoico es un fuerte inhibidor competitivo.

El ácido antranílico (o-aminobenzoico) resultó ser el inhibidor más potente, lo que se explica debido a que el sustituyente del anillo benceno tiene el potencial de presentar una polaridad positiva por lo que la afinidad se incrementa. Esto sugiere una probable función de las porciones electrostáticas e hidrofóbicas en la trayectoria del sustrato al sitio activo, por lo que para una inhibición exitosa sería importante que las superficies electrostáticas e hidrofóbicas de la

molécula del inhibidor se complementen. Sin embargo, en este caso el modelo de inhibición es no competitivo lo que sugeriría que la interacción de este con los residuos positivos no se da a nivel de residuos básicos en el sitio activo, sino más bien en el túnel antes de la entrada al sitio activo.

Respecto a los ácidos benzoicos orto-sustituidos: ácido salicílico y acetilsalicílico, tenemos que son menos afines a la enzima (valores de K_i mayores), lo que se debe probablemente a que exhiben una mayor acidez (valores de pK_a menores) por ser sustituyentes en orto (Fessenden y Fessenden, 1982), lo que nos revela que la acidez del grupo carboxilo, presente también en los sustratos, es un factor que podría incidir en la fuerza de unión del sustrato a la enzima. Estos ácidos exhibieron además un patrón de inhibición del tipo mixto. Al ser más ácidos, esto podría indicar tal como lo sugirió Page y Vanetten, (1971), para la LAO de *C. adamanteus* que el mecanismo de catálisis general implicado en la reacción enzimática utilizando L-leucina como sustrato es de naturaleza básica. De este modo, la transferencia del protón del sustrato al FADH estaría mediada por un grupo básico del centro activo de la enzima.

Resumiendo se puede decir que la estructura farmacofórica de un inhibidor de la L-aminoácido oxidasa de especies del género *Bothrops* debe poseer al menos un grupos aromático con un sustituyente con carga negativa y otro sustituyente con polaridad positiva, con el fin de que tenga una mayor fuerza de unión al centro activo de la enzima y se inhiba de esta manera su actividad enzimática con lo que se reduciría al menos parcialmente los efectos tóxicos del veneno.

CONCLUSIONES

1. La L-aminoácido oxidasa del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* fue purificada al estado homogéneo en dos pasos cromatográficos: una columna de Sephadex G-75, seguida de un fraccionamiento en CM-Sephadex C-50 a pH 6.0.
2. A pH 8.5 y 7.5 mM de sustrato, la enzima mostró mayor actividad específica sobre los aminoácidos L-metionina, L-leucina, L-arginina y L-fenilalanina.
3. El rango de pH de LAO para su actividad sobre L-metionina, L-fenilalanina y L-arginina fue de de 6.9 a 9.6.
4. El sustrato catalíticamente más eficiente para LAO de *Bothrops atrox* fue L-leucina con un K_m de 0.1183 (mM) y un valor de eficiencia catalítica K_{cat}/K_m de 71.213×10^4 ($s^{-1} M^{-1}$) a pH 8.5.
5. La actividad de LAO fue inhibida de modo no competitivo por ácido antranílico, de modo competitivo cuando se empleó ácido benzoico, y en forma mixta con ácido salicílico y ácido sulfanílico.
6. El inhibidor más eficiente sobre la actividad de LAO de *Bohtops atrox* fue el ácido antranílico con un valor de K_i de 0.008226 (mM).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, Y., SHIMOYAMA, Y., MUNAKATA, H., ITO, J., NAGATA, N. y OHTSUKI, K. Characterization of an apoptosis-inducing factor in Habu snake venom as a glycyrrhizin (GL)-binding protein potentially inhibited by GL in vitro. Biol Pharm Bull. 1998; 21: 924-927.

AMARAL, A. Serpentes do Brasil: Iconografia colorida. 2^a ed., Ed. Melhoramentos, São Paulo, 1977.

BARRAVIERA, B. Venenos Animais: uma visão integrada. Rio de Janeiro, EPUB, 1994. cap.63 p.97-105,

BARRAVIERA, B. y PEREIRA, P.C.M. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*, em: Venenos: Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos. Rio de Janeiro, EPUB 1999, p.411.

BRAGA, MD., MARTINS, AM., AMORA, DN., DE MENEZES, DB., TOYAMA, MH., *et al.* Purification and biological effects of L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops insularis* venom. Toxicon. 2008. Feb;51(2):199-207.

CARRILLO, N. y ICOCHEA, J. Lista taxonómica preliminar de los reptiles vivientes del Perú. Publicaciones del Museo de Historia Natural Javier Prado. UNMSM. 1995; Serie A (49): 27.

CHU, C.C. y PAUL, W.E. Interleukin 4-induced mouse B cell gene isolated by cDNA representational difference analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. 1997. v.94, p.2507-2512.

CISNEROS, Y.; LAZO, F., GUTIÉRREZ, S., YARLEQUÉ, A. Características bioquímicas de una proteína antibacteriana aislada del veneno de *Lachesis muta* "Shushupe". Rev. Soc. Quím. Perú, oct./dic. 2006, vol.72, no.4, p.187-196. ISSN 1810-634X.

CURTI, B., RONCHI, S. y IMONETTA, S. D- and L- amino acid oxidases. In: Mueller F, editor. Chemistry and Biochemistry of Flavoenzyme, Boca Ratón: CRC Press; 1992. p. 69-94.

DE KOK, A. y VEEGER, C. Studies on L- amino acid oxidase I. Effects and the competitive inhibitors. Biochim Biophys Acta 1968; 33:345.

DU, X.Y. y CLEMETSON, K.J. Snake venom L- amino acid oxidases. Toxicon 2002; 40(6): 659-665.

EISENBERG, D., WEISS, R.M., TERWILLIGER, T.C. y WILCOX, W: Hydrophobic moments in protein structure. Faraday Symp Chem Soc 1982, 17:109-120.

FESSENDEN, R. y FESSENDEN, J. Organic Chemistry. Boston. Edit PWS, Publishers. 1982. Pp 1078.

FRANCA, S.C., KASHIMA, S., ROBERTO, P.G., MARINS, M., TICLI, F.K., *et al.* Molecular approaches for structural characterization of *Bothrops* L-amino acid oxidases with anti protozoal activity: cDNA cloning, comparative sequence analysis, and molecular modeling. Biochem Biophys Res Commun. 2007. 355, 302–306.

HEREDIA, V., CAMPOS, S. y YARLEQUÉ, A. 5' nucleotidase activity in the venom of *Bothrops atrox* (L.) Jergón. Acta Cient Venez. 1982;33(4):333-7.

HUATUCO, S., ESCOBAR, E. y YARLEQUÉ, A. Aislamiento y caracterización parcial de una miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (Ophidia: Viperidae). Rev Peru Biol. 2004;11(1):79-86.

IWANAGA, S. y SUZUKI, T. Enzymes in snake venoms. In: Lee CY, editor. Handbook of Experimental Pharmacology. (Snake venoms). Berlin: Springer-Verlag; 1979, 52: 75-84.

IZIDORO, L.F., RIBEIRO, M.C., SOUZA, G.R., SANT`ANA, C.D., HAMAGUCHI, A., *et al.* Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. Bioorg. Med. Chem., 2006. v.14, p.7034-43.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970. 227: 680-685.

LAZO, F., MALAGA, O., YARLEQUE, A. *et al.* Algunas propiedades bioquímicas de una L-aminoácido oxidasa aislada del veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. Rev. Soc. Quím. Perú, jul./set. 2007, vol.73, no.3, p.131-141. ISSN 1810-634X.

LAZO, F., MALAGA, O., YARLEQUE, A. *et al.* Actividad antimicrobiana de una flavoproteína aislada del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* ("jergón"). Rev. Soc. Quím. Perú, oct./dic. 2007, vol.73, no.4, p.197-207. ISSN 1810-634X.

Li , Z.Y., YU, T.F. y LIAN, E. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophaqus hannah*) Venom and its effects on human platelet aggregation. Toxicon 1994; 32(11): 1349 – 1358.

LOAYZA, S., MORANTE, Y., CAMPOS, S., y YARLEQUE, A. Enzimas proteolíticas en el veneno de las serpientes peruanas *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. Bol Soc Quim del Perú 1985; LII (3): 151-163.

LOJA, D., AVILES, R., NECOCHEA, Y., VILCA, M. y CASTRO, J. Ofidismo por *Bothrops atrox*: estudio clínico-epidemiológico. Diagnóstico 2000; 39(5):261-5.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-275.

MACHEROUX, P., SETH, O., BOLLSCHWEILER, C., SCHWARZ, M. , KURFURST, M., AU y L.C., GHISLA, S. L- Amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. Comparative sequence analysis and characterization of active and inactive forms of the enzyme. Eur J Biochem 2001; 268: 1679-1686.

MASUDA, S., ARAKI, S., YAMAMOTO,T., KAJI, K. y HAYASHI, H. Purification of a vascular apoptosis-inducing factor from hemorrhagic snake venom. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997. v.235, p.59-63.

MEBS D. A comparative study of enzyme activities in snake venoms International. J Biochem 1970; 1: 335-342.

MOUSTAFA, IM., FOSTER. S., LYUBIMOV, AY. y VRIELINK, A. Crystal structure of LAAO from *Calloselasma rhodostoma* with an L-phenylalanine substrate: insights into structure and mechanism. J. Mol Biol. 2006. Dec 15;364(5):991-1002.

OREJUELA, P., ZAVALITA, A., SALAS, M. y MARSH, N. Thrombin-like activity in snake venoms from Peruvian *Bothrops* and *Lachesis* genera. Toxicon.1991; 29(2):1151-4.

PAGE, D. y VAN ETEN, R. L- amino acid oxidase. II. Deuterium isotope effects and the actino mechanism for the reduction of L- amino acid oxidase by L- leucine. Biochim Biophys Acta 1971; 227: 16-31.

PANTIGOSO, C., ESCOBAR, E., MALAGA, O. y YARLEQUE, A. Aislamiento y algunas propiedades de la atroxina, una proteinasa del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* "Jergón". Acta Científica venezolana 1996; 47:67-73.

PAWELEK, P., CHEAH, J., COULOMBE, R., MACHEROUX, P., GHISLA, S. y VRIELINK, A. The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. *Embo Journal*, 2000. v.19, p.4204-15.

PONNUDURAI, G., CHUNG, M.C. y TAN, N.H. Purification and properties of the L- amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom. *Arch Biochem Biophys* 1994; 313(2): 373-378.

PORTER, D.J. y BRIGHT, H.J. Interpretation of the pH dependance of flavin reduction in the L-amino acid oxidase reaction. *J Biol Chem* 1980; 255: 2969-2975.

RAIBEKAS, A.A. y MASSEY, V. Primary structure of the snake venom L-amino acid oxidase shows high homology with the mouse B cell interleukin 4-induced protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1998. v.248, p.476-478.

SAKURAI, Y., TAKATSUKA, H., YOSHIOKA, A., MATSUI, T., SUZUKI, M. TITÁN, K. y FUJIMURA, Y. Inhibition of human platelet aggregation by L- amino acid oxidase purified from *Naja naja kaouthia* venom. *Toxicon* 2001; 39(12): 1827-1833.

SAMEL, M.; VIJA, H.; RONNHOLM, G.; SIIGUR, J.; KALKKINEN, N. y SIIGUR, E. Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting L-amino acid oxidase from *Vipera berus berus* (common viper) venom. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006. v.1764, p.707-14.

SHAHAM, N. y BDOLAH, A. L- amino acid oxidase from *Vipera palestinae* venom: Purification and assay. *Comp Biochem Physiol* 1973; 46B: 691-698.

SANCHEZ, E. y MAGALHAES, A. Purification and partial characterization of an L- amino acid oxidase from bushmaster snake (Surucucu pico de jaca) *Lachesis muta muta* venom. *Brazilian J Med Biol Res* 1991; 24: 249-260.

SANT'ANA, C.D. Caracterização funcional e estrutural de uma nova serinoprotease do veneno de *Bothrops jararacussu*. Dissertação de mestrado apresentado à FCFRP-USP, 2005. p.109.

SOLIS, C., ESCOBAR, E., YARLEQUE, A. y GUTIERREZ, S. Purificación y caracterización de la L-aminoácido oxidasa del veneno de la serpiente *Bothrops brazili* "Jergón shushupe" Rev peru biol, 1999; 6(1): 75-84.

SOUZA, D.H., EUGENIO, L.M., FLETCHER, J.E., JIANG, M.S., GARRATT, R.C., *et al.* Isolation and structural characterization of a cytotoxic L- amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom: preliminary crystallographic data. Arch Biochem Biophys, 1999; 368: 285-290.

STILES, B.G.; SEXTON, F.W. y WEINSTEIN, S.A. Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. Toxicon, 1991. v.29, p.1129-1141.

SUHR, S.M. y KIM, D.S. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 1996; 224 (1): 134-139.

SUZUKI, T. y IWANAGA, S. Studies on snake venom. VIII. Substrate specificity of L- amino acid oxidase in Mamushi (*Agkistrodon halys blomhoffii* Boie) and Habu (*Trimeresurus okinavensis* Baulenger) venoms. Yakugaku Zasshi 1960; 80: 1002.

TAKATSUKA, H., SAKURAI, Y., YOSHIOKA, A., KOKUBO, T., USAMI, Y., *et al.* Molecular caharacterization of L- amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii* with special reference to platelet aggregation. Biochim Biophys Acta 2001; 1544: 267-277.

TAN, N.H., KANTHIMATHI, M. y TAN, C.S. Enzymatic activities of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper) venom. Toxicon 1986; 24(6): 626-630.

TAN, N.H. y SWAMINATHAN, S. Purification and properties of the L- amino acid oxidase from monocellate cobra (*Naja naja kaouthia*) venom. Internat J Biochem 1992; 24: 967-973.

TAN, N.H. y CHOY, S.K. The edema inducing activity of *Ophiophagus hannah* (King cobra) venom L- amino acid oxidase. Toxicon 1994; 32(5): 539 .

TEMPONE, A.G.; ANDRADE Jr., H.F.; SPENCER, P.J.; LOURENÇO, C.O.; ROGERO, J.R. y NASCIMENTO, N. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. With hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001. v.280, p.620-624.

TORII, S., NAITO, M. y TSURUO, T. Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from Western diamondback rattlesnake venom. J. Biol. Chem. 1997. v.272, p.9539-9542.

TORII, S., YAMANE, K., MASHIMA, T., HAGA, N., YAMAMOTO, K., *et al.* Molecular cloning and functional análisis of apotoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity. Biochemistry 2000; 39: 3197-3205.

TOYAMA, M.H., TOYAMA, D. de O., PASSERO, L.F., LAURENTI, M.D., CORBETT, C.E., *et al.* Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. Toxicon, 2006. v.47, p.47-57.

TU, A.T. Venoms: chemistry and molecular biology. Ed. John Wiley & Sons, New York, 1977. p.560.

YARLEQUE, A., CARDENAS, J., ESCOBAR, E. y GUTIERREZ, S. Some biochemical properties and antibacterial action of a L- amino acid oxidase from Peruvian snake venoms. Toxicon 1997; 35(4) : 489.

WARBURG, O. y CHRISTIAN, W. Isolierung and cristallisation del Gärungs ferments enolase. Biochemische Zertschrift. 1941; 31: 384-421.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Progress in Characterization of Venoms and Standartization of Antivenoms. Geneva: World Health Organization. 1981.

WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION. L-Amino Acid Oxidase. New Jersey: The Worthington Enzymes Manual. Enzymes Related Biochemicals; 1993 p. 34-35.

ZHANG, Y.J., WANG, J.H., LEE, W.H., WANG, Q., LIU, H., *et al.* Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. Bioch. Biophys. Res. Comm. 2003. v.309, p.598-604.

ZHANG, H., TENG, M., NIU, L., WANG, Y., WANG, Y., *et al.* Purification, partial characterization, crystallization and structural determination of AHP-LAAO, a novel L-amino-acid oxidase with cell apoptosis-inducing activity from *Agkistrodon halys pallas* venom. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2004 May;60(Pt 5):974-7.

ZELLER, A. y MARITZ, A. Über eine neue L-aminosaure Oxidase. Helv Chim Acta 1944; 27: 1888-1902.

ZELLER, A. Enzymes of snake venoms and their biological significance. Adv Enzymol 1948; 3: 459.

ZELLER, A. Snake venom action: are enzymes involved in it? Experientia 1977; 33: 143-150.

TABLAS Y FIGURAS



Figura. Nº 1. La serpiente peruana *Bothrops atrox* “Jergón”

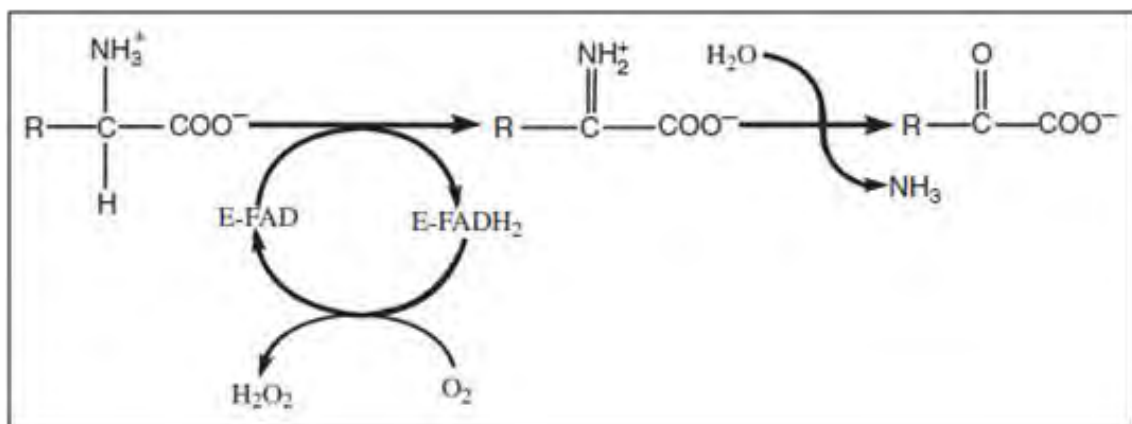


Figura. Nº 2. Mecanismo de reacción de la L-aminoácido oxidasa

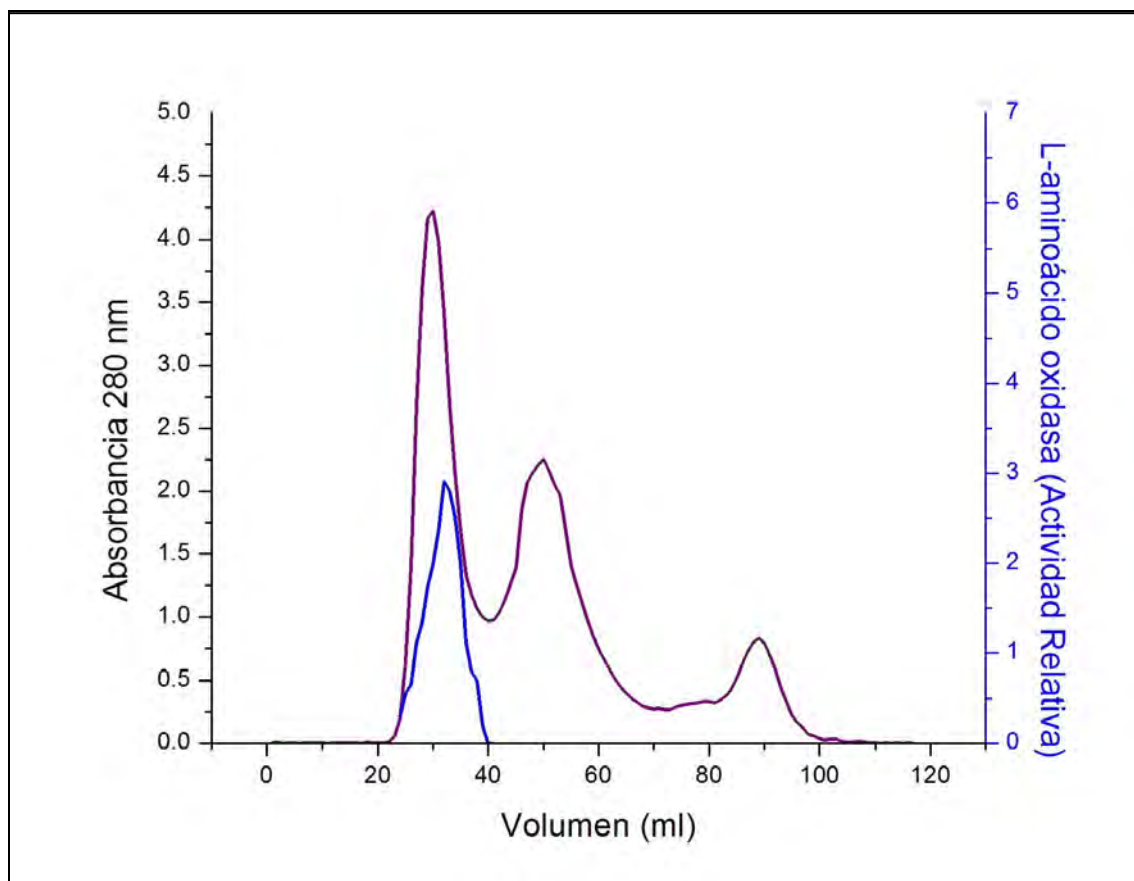


Figura. Nº 3. Cromatografía del veneno de *Bothrops atrox* en Sephadex G-75. En azul se muestran las fracciones con actividad de L-aminoácido oxidasa.

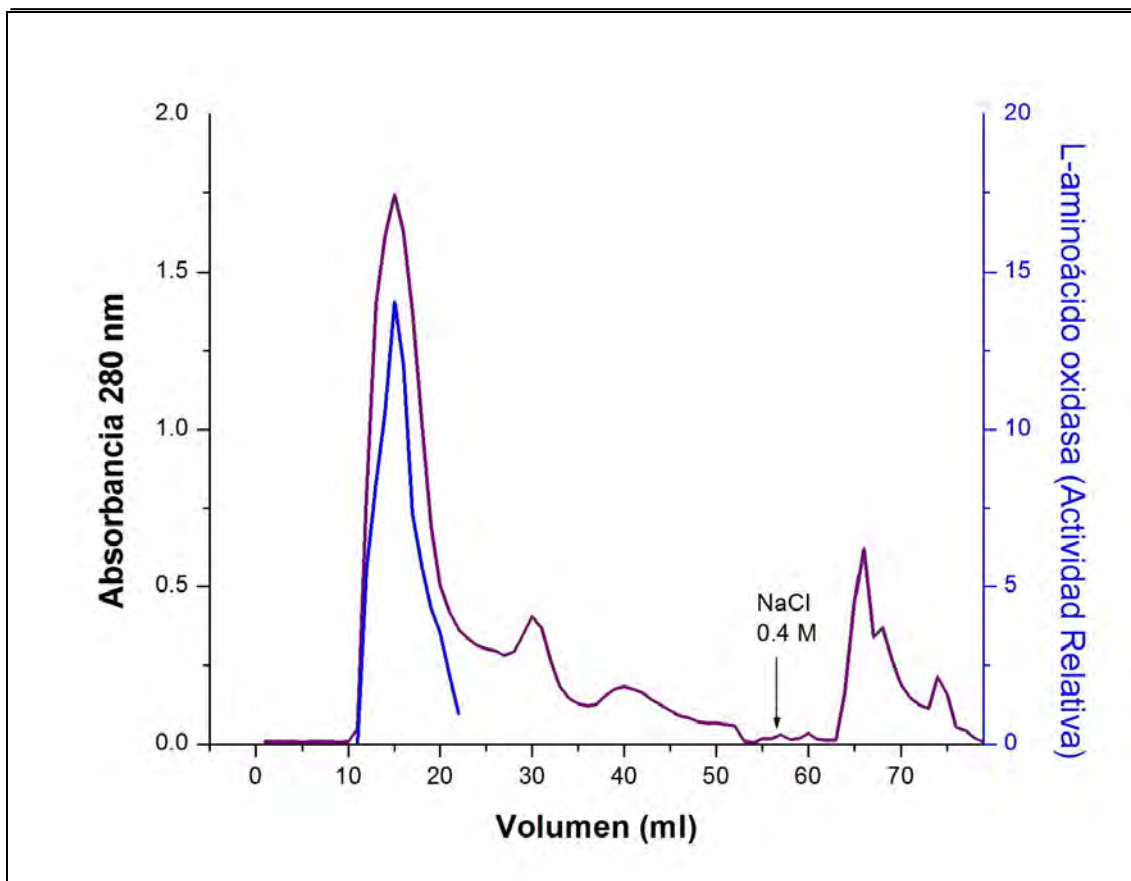


Figura. Nº 4. Purificación de la L-aminoácido Oxidasa de *Bothrops atrox* en CM-Sephadex C-50. En azul se muestran las fracciones con actividad de L-aminoácido oxidasa.

Muestra	Cantidad de Proteína		A.E	UTA	Purificación	Rendimiento (%)
	mg	%				
Veneno crudo	106	100	0,36	38.16	1	100
Sephadex G-75	32,7	38,85	0.94	30.7	2,6	80.5
CM-Sephadex C-50	2,27	2,14	8.58	19.49	23.83	51.1

AE : Actividad específica

UTA : Unidades totales de actividad

Tabla 1. Cuadro de purificación de la L-aminoácido oxidasa de *Bothrops atrox* ("Jergón")

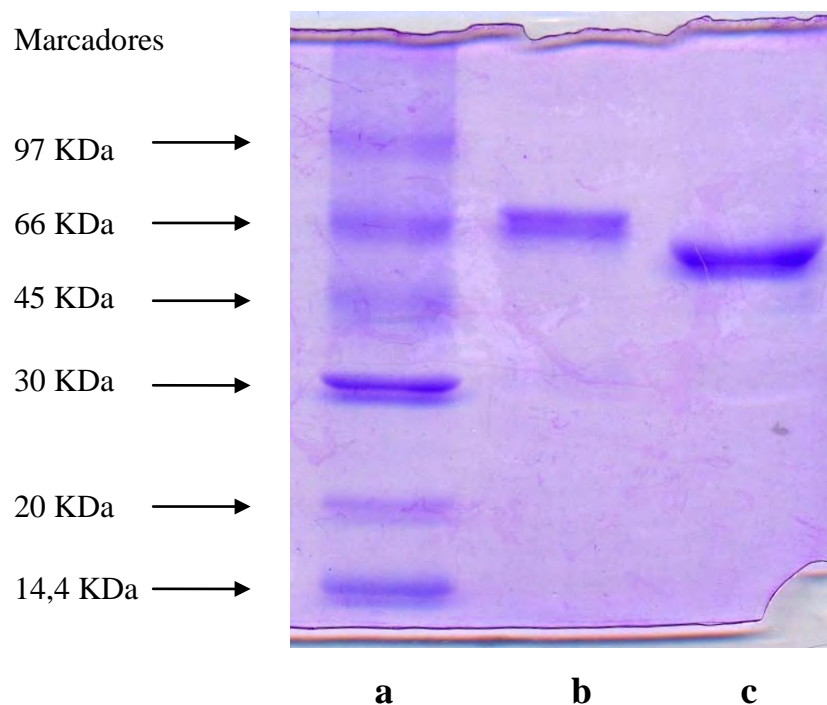


Figura. Nº 5. Electroforesis de L-aminoácido oxidasa purificada del veneno de *Bothrops atrox*

- a) Marcadores de peso molecular: Fosforilasa B (97 KDa), BSA (66 KDa), Ovalbumina (45 KDa), inhibidor de tripsina de soya (30 KDa), anhidrasa carbónica (20 KDa) y lisozima (14.4 KDa), cada proteína a una concentración de 2 mg/ml.
- b) L-aminoácido oxidasa en condiciones reductoras (65.8 Kda)
- c) L-aminoácido oxidasa en condiciones no reductoras (54.6 KDa)

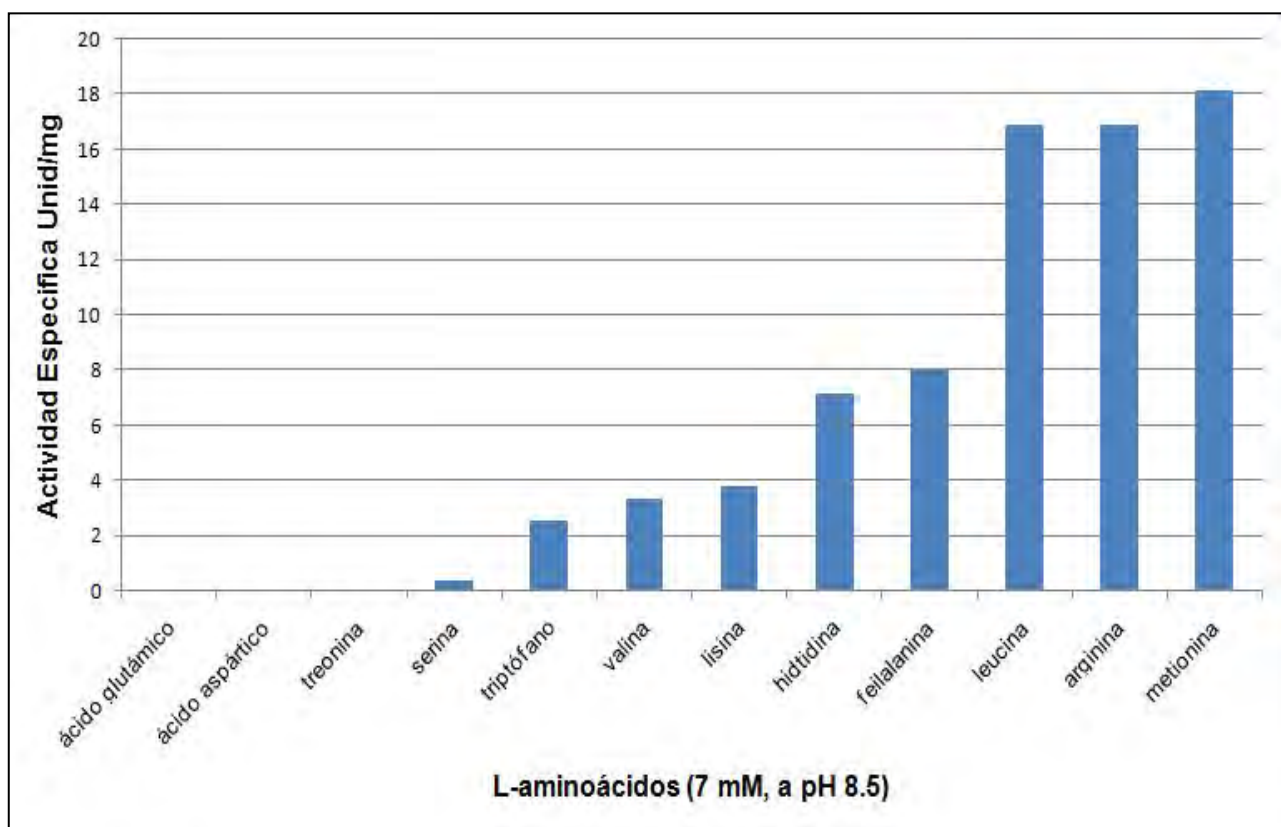


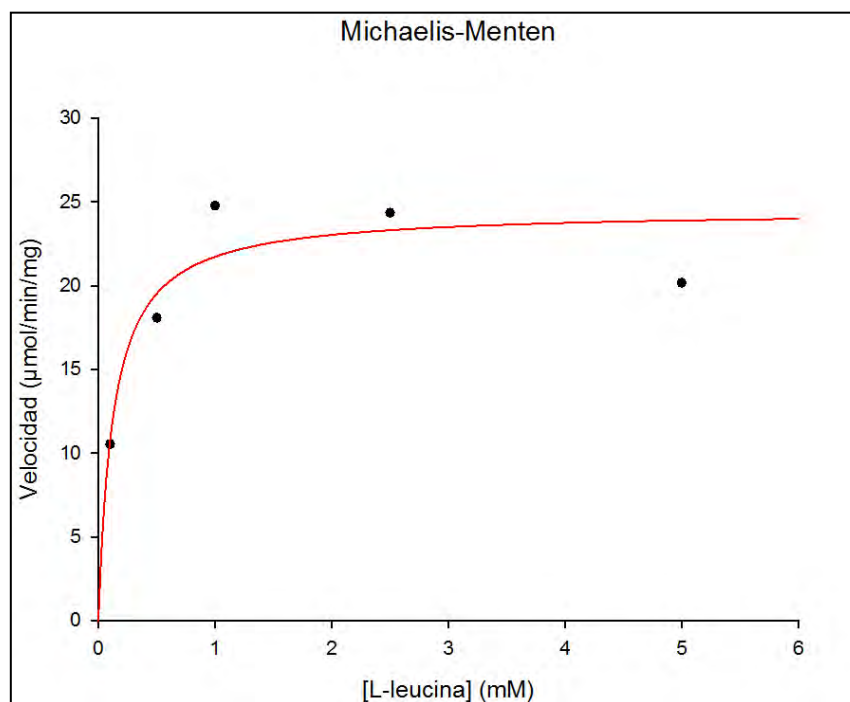
Figura. Nº 6. Actividad Específica sobre varios sustratos L-aminoácidos.

L-aminoácido	Actividad Específica Unid/mg	Indice de hidrofobicidad (*)	Polar/ Hidrofóbico	pI
ácido glutámico <chem>H2N(=NH)NHC3H6CCH(NH2)COOH</chem>	0.00	- 3.5	Polar (Acido)	3.22
ácido aspártico <chem>HOOCCH2CH(NH2)COOH</chem>	0.00	- 3.5	Polar (Acido)	2.77
Treonina <chem>CH3CH(OH)CH(NH2)COOH</chem>	0.00	- 0.7	Polar (Neutral)	6.16
Serina <chem>HOCH2CH(NH2)COOH</chem>	0.42	-0.8	Polar (Neutral)	5.68
Triptófano <chem>(C8H6N)-CH2CH(NH2)COOH</chem>	2.54	- 0.9	No polar (Hidrofóbico)	5.89
Valina <chem>(CH3)2CHCH(NH2)COOH</chem>	3.38	+ 4.2	No polar (Hidrofóbico)	5.96
Lisina <chem>H2N(CH2)4CH(NH2)COOH</chem>	3.81	- 3.9	Polar (Básico)	9.74
Histidina <chem>H2NCH[CH2(C3H3N2)]COOH</chem>	7.19	- 3.2	Polar (Básico)	7.59
Fenilalanina <chem>(C6H5)CH2CH(NH2)COOH</chem>	8.03	+ 2.8	No polar (Hidrofóbico)	5.48
Leucina <chem>(CH3)2CHCH2CH(NH2)COOH</chem>	16.91	+ 3.8	No polar (Hidrofóbico)	5.98
Arginina <chem>H2N(=NH)NHC3H6CCH(NH2)COOH</chem>	16.91	- 4.5	Polar (Básico)	10.76
Metionina <chem>CH3SCH2CH2CH(NH2)COOH</chem>	18.18	+ 1.9	No polar (Hidrofóbico)	5.74

(*)Eisenberg. D. *et al.* (1984). J. Mol. Biol. 179, 125-42

Tabla 2. Cuadro comparativo de actividad específica sobre L-aminoácidos y las propiedades de los aminoácidos.

a)



b)

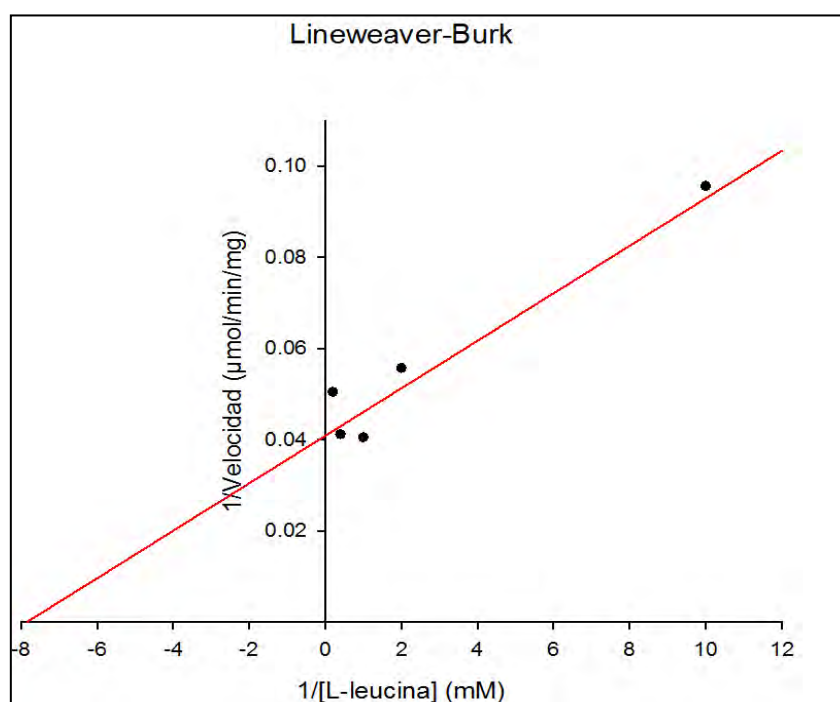
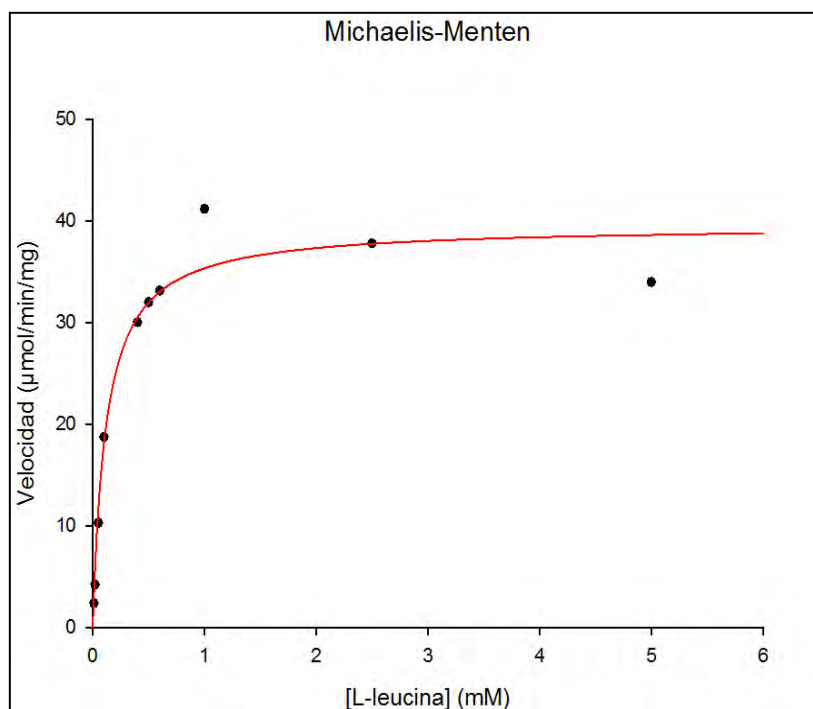


Figura N° 7 Determinación de parámetros cinéticos para L-leucina a pH 7.5.

a) Representación de Michaelis-Menten

b) Representación de Lineweaver Burk

a)



b)

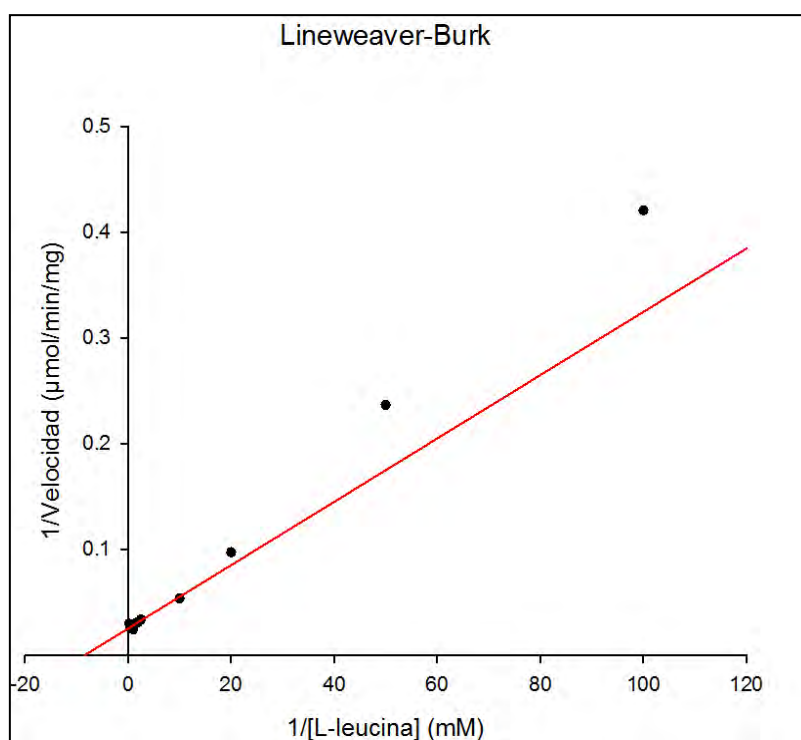
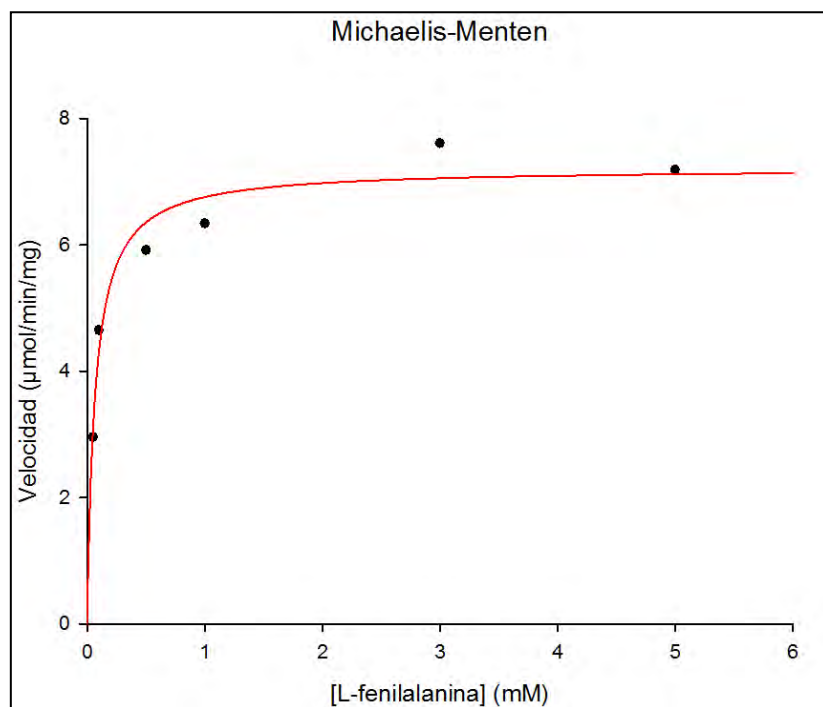


Figura N° 8 Determinación de parámetros cinéticos para L-leucina a pH 8.5.

a) Representación de Michaelis-Menten

b) Representación de Lineweaver Burk

a)



b)

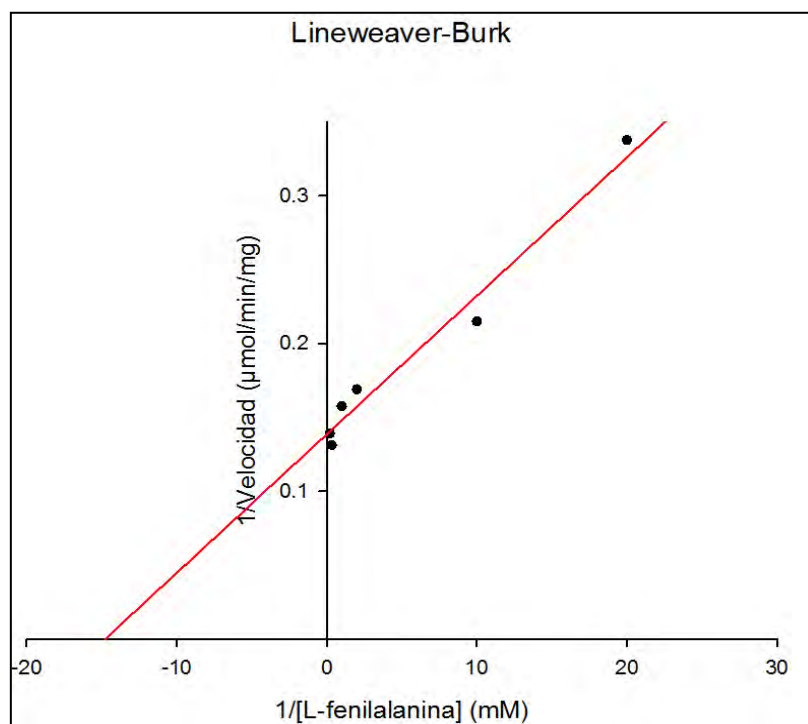
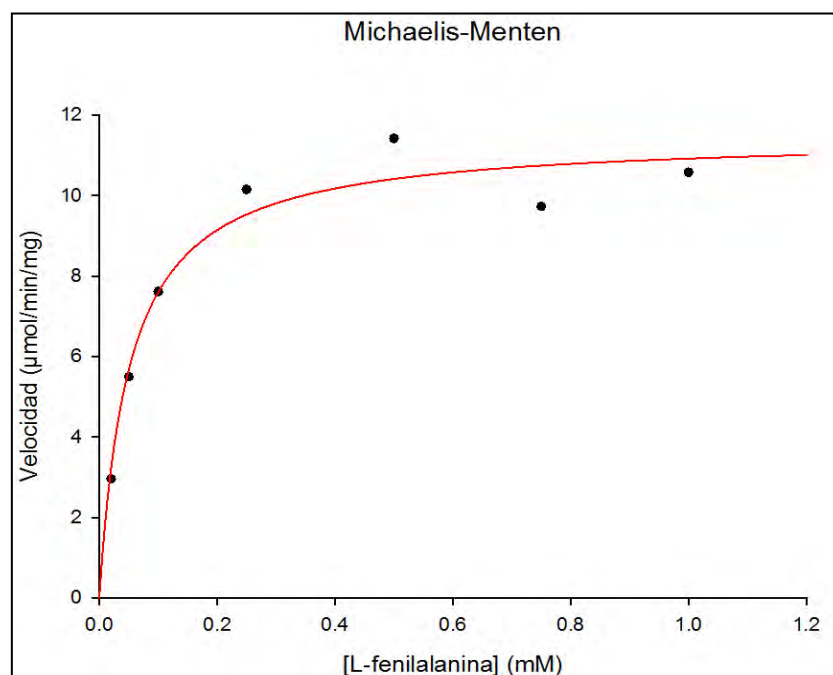


Figura N° 9 Determinación de parámetros cinéticos para L-fenilalanina a pH 7.5.

a) Representación de Michaelis-Menten

b) Representación de Lineweaver Burk

a)



b)

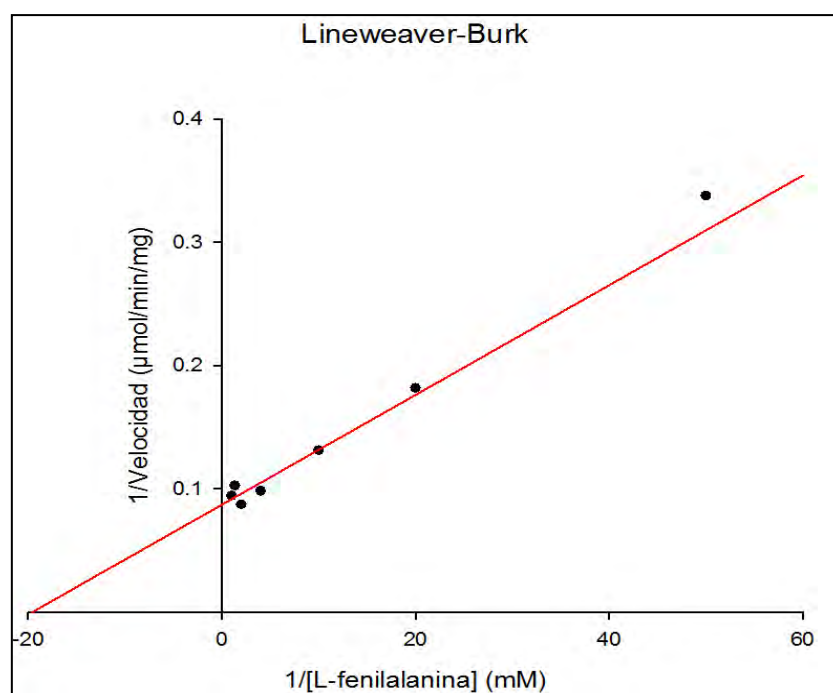
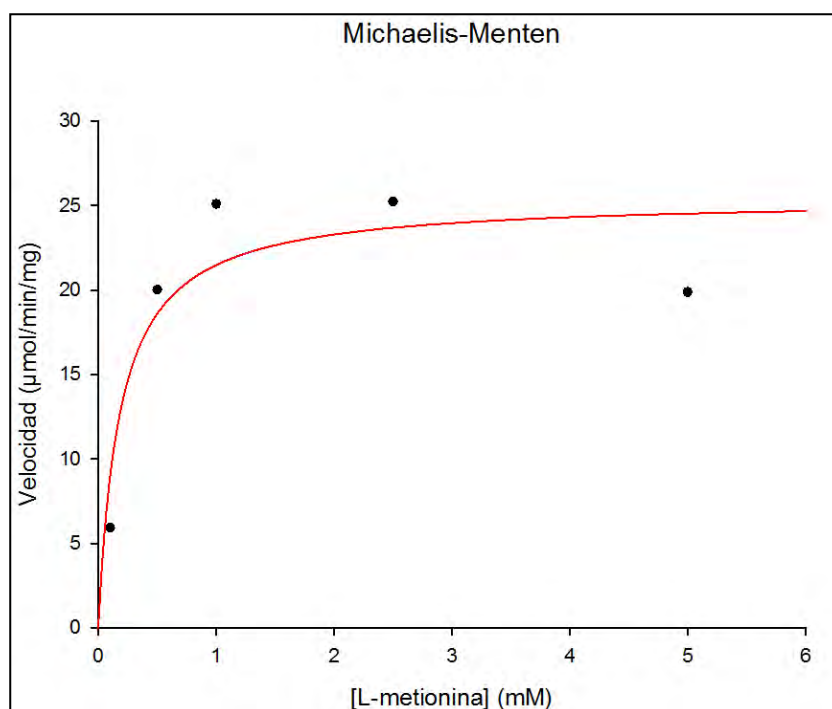


Figura N° 10 Determinación de parámetros cinéticos para L-fenilalanina a pH 8.5.

a) Representación de Michaelis-Menten

b) Representación de Lineweaver Burk

a)



b)

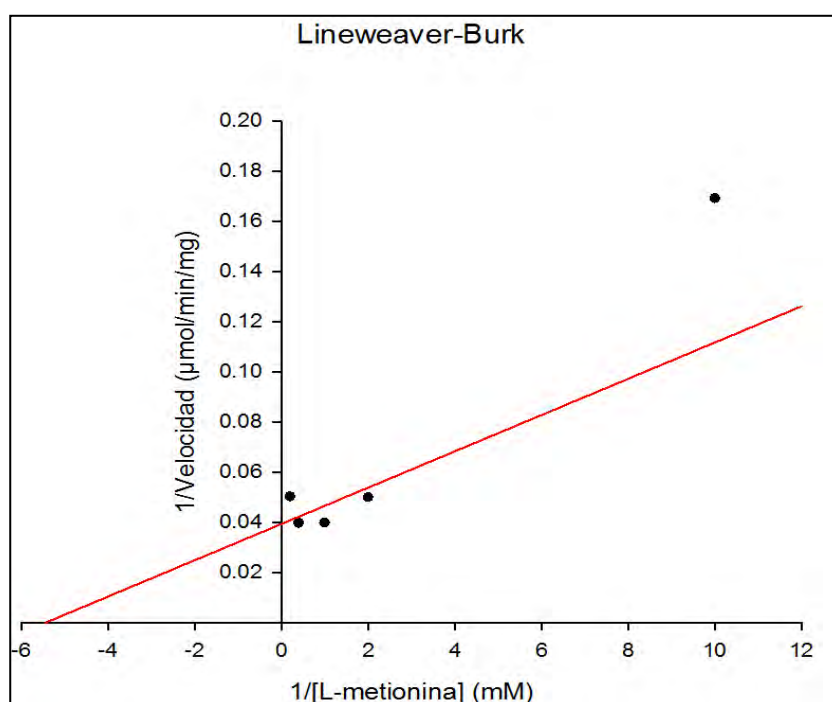
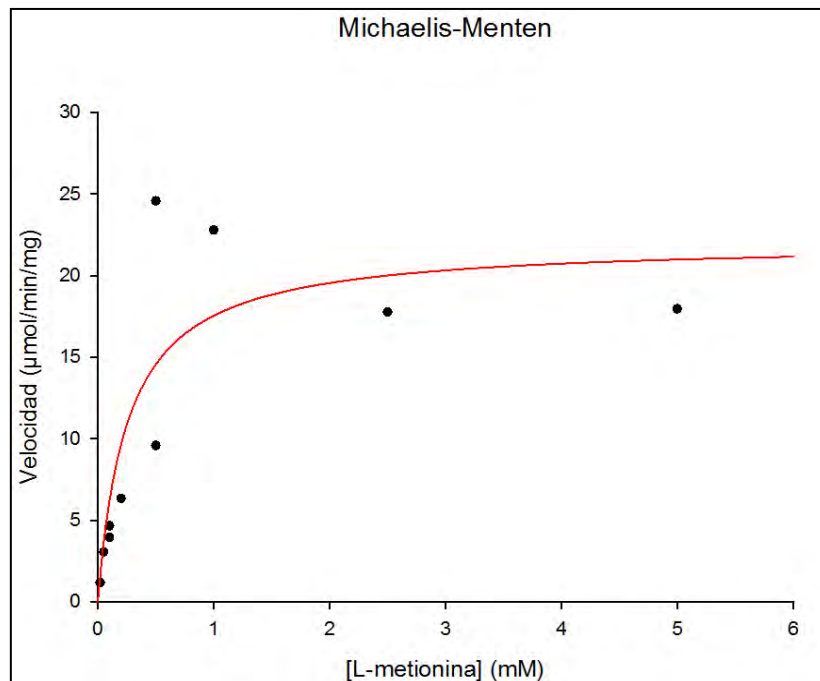


Figura N° 11 Determinación de parámetros cinéticos para L-metionina pH 7.5.

a) Representación de Michaelis-Menten

b) Representación de Lineweaver Burk

a)



b)

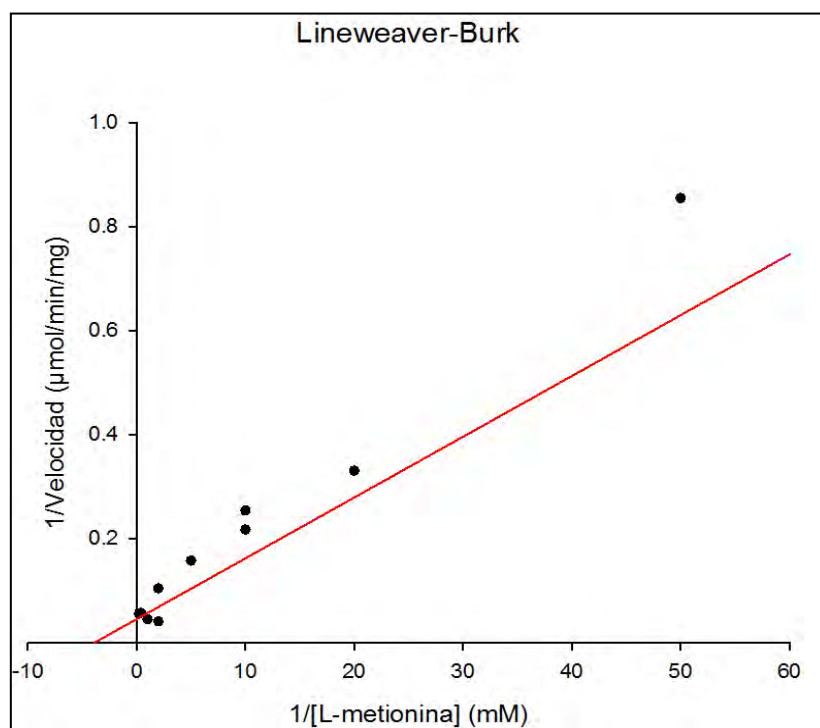
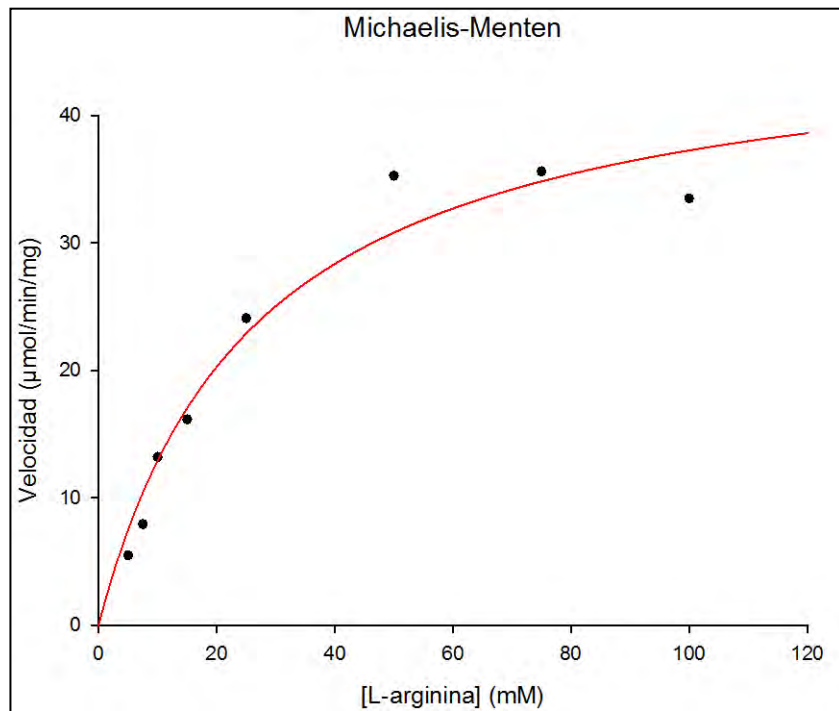


Figura N° 12 Determinación de parámetros cinéticos para L-metionina pH 8.5.

a) Representación de Michaelis-Menten

b) Representación de Lineweaver Burk

a)



b)

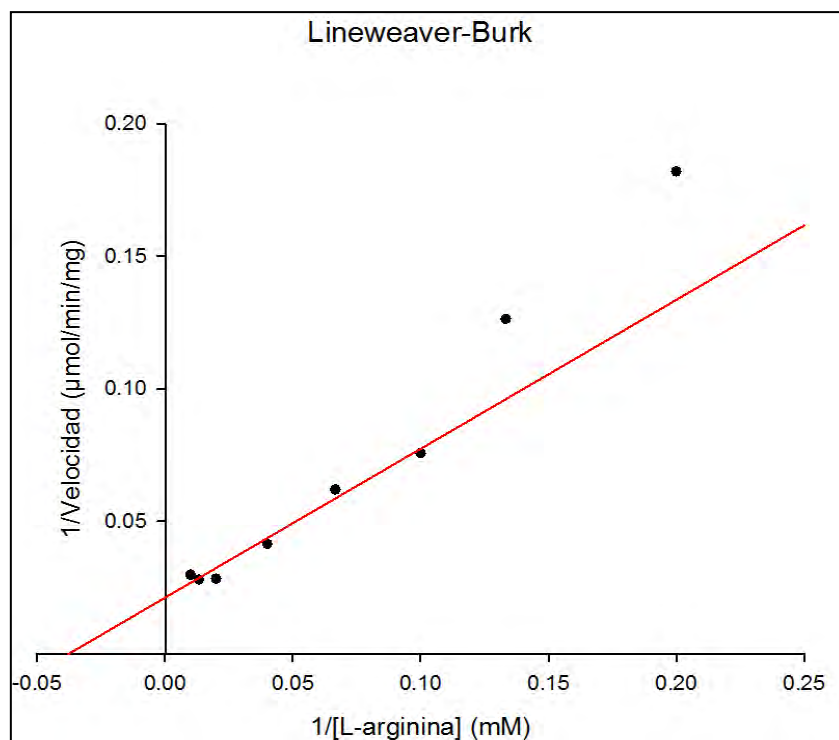
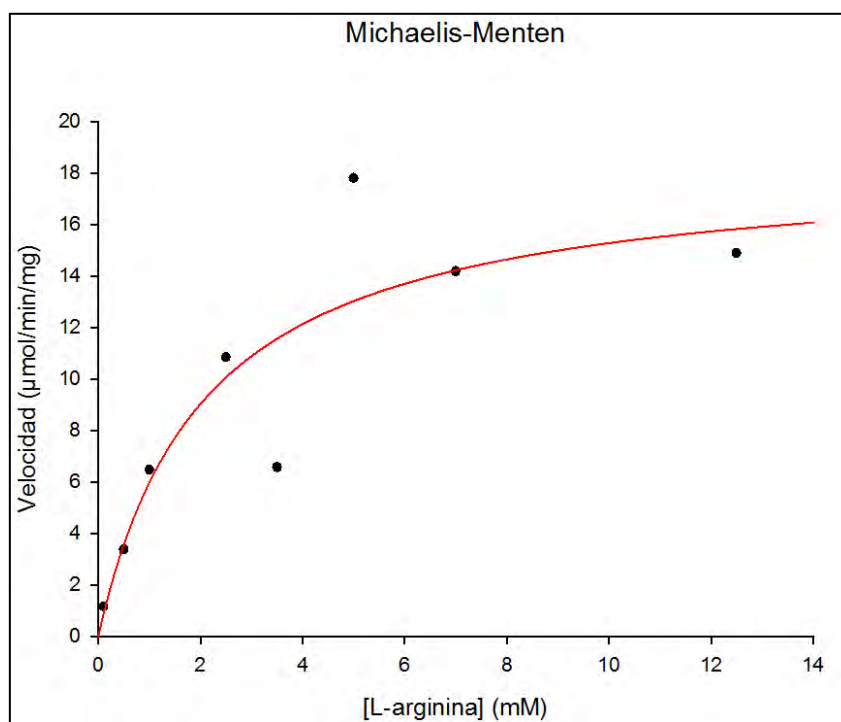


Figura N° 13 Determinación de parámetros cinéticos para L-arginina pH 7.5.

a) Representación de Michaelis-Menten

b) Representación de Lineweaver Burk

a)



b)

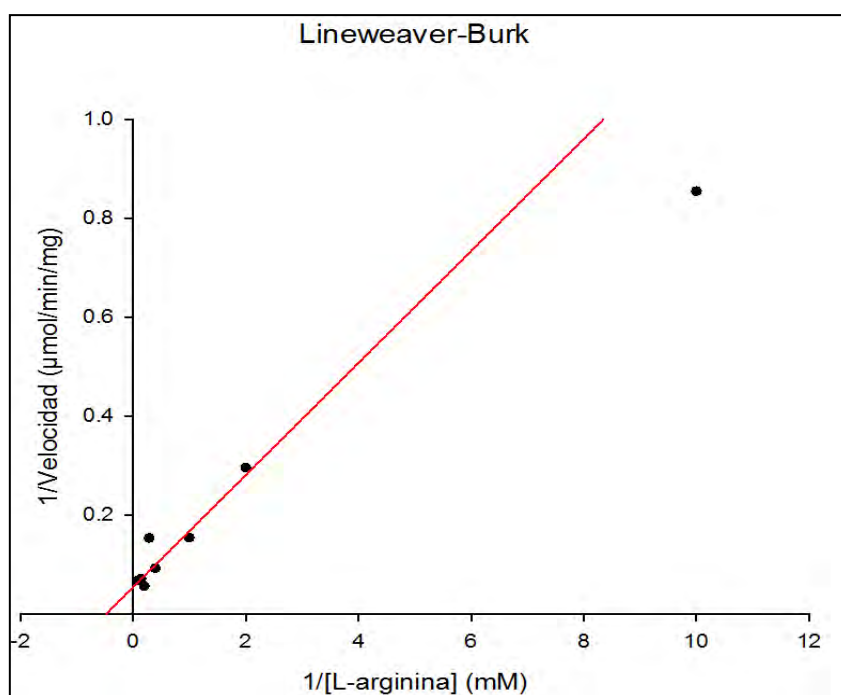


Figura Nº 14 Determinación de parámetros cinéticos para L-arginina pH 8.5.

a) Representación de Michaelis-Menten

b) Representación de Lineweaver Burk

Sustrato	pH	K_m (mM)	V_{max} (μ moles/min/mg)	R^2	Sy.x
L-leucina	7.5	$0.127 \pm 3.67e-2$	24.490 ± 1.252	0.783	2.790
	8.5	$0.118 \pm 1.471e-2$	39.529 ± 1.016	0.962	2.758
L-fenilalanina	7.5	$6.763e-2 \pm 1.42e-2$	7.214 ± 0.272	0.946	0.449
	8.5	$5.104e-2 \pm 1.077e-2$	11.470 ± 0.518	0.954	0.729
L-metionina	7.5	$0.283 \pm 5.849e-2$	29.902 ± 1.612	0.943	2.084
	8.5	$0.449 \pm 5.962e-2$	22.981 ± 0.873	0.991	0.838
L-arginina	7.5	26.465 ± 3.442	47.122 ± 2.378	0.954	2.593
	8.5	1.652 ± 0.200	17.259 ± 0.629	0.975	0.884

Tabla 3. Valores de K_m y V_{max} para la L-aminoácido oxidasa sobre diferentes sustratos. Estimación de acuerdo al modelo de Michaelis y Menten.

Sustrato	pH	k_m	$K_{cat} (s^{-1})$	$K_{cat}/K_m (s^{-1} M^{-1}) \times 10^4$
L-leucina	7,5	0.128	52.192	40.903
	8,5	0.118	84.245	71.213
L-fenilalanina	7,5	6.763e-2	15.177	22.441
	8,5	5.104e-2	24.444	47.893
L-metionina	7,5	0.283	63.722	22.540
	8,5	0.449	48.974	10.905
L-arginina	7,5	26.465	100.421	0.380
	8,5	1.652	36.784	2.227

Tabla 4. Valores de K_{cat} y eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m) para la L-aminoácido oxidasa sobre diferentes sustratos.

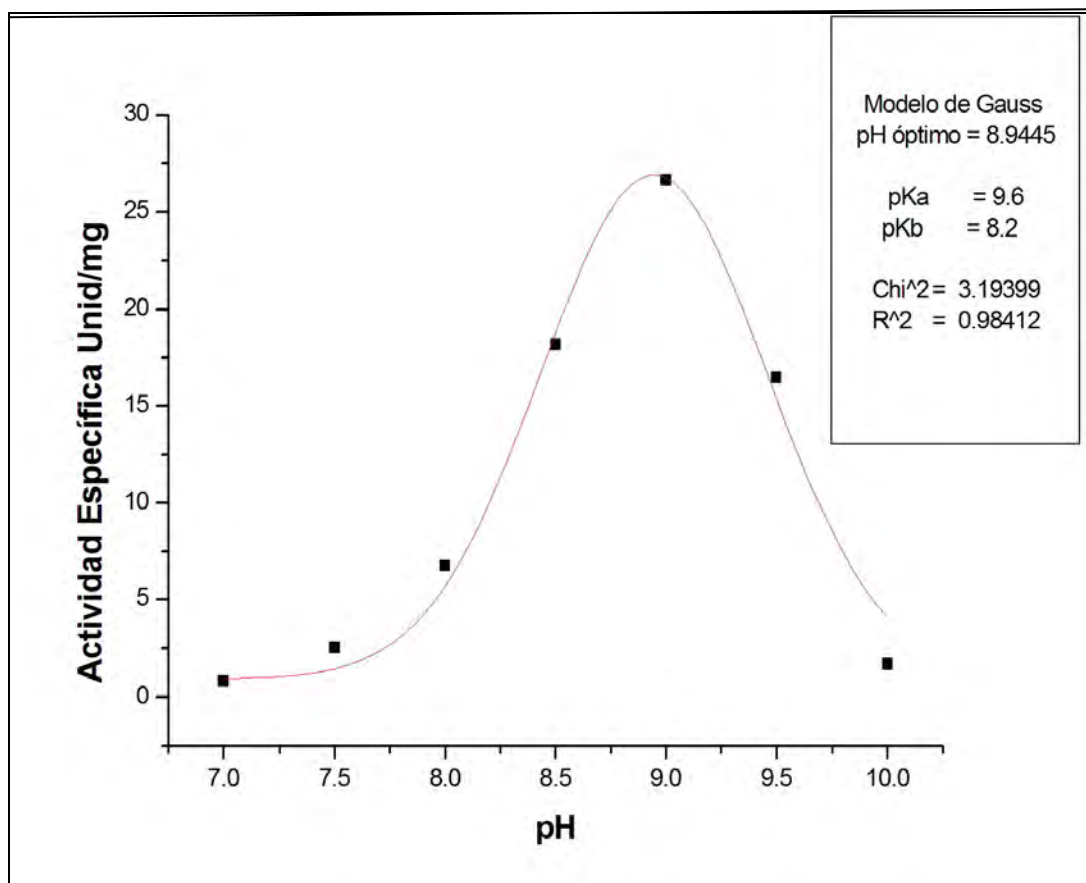


Figura N° 15 Determinación del pH óptimo de actividad de la L-aminoácido oxidasa del veneno de *Bothrops atrox* sobre L-arginina (7,5 mM).

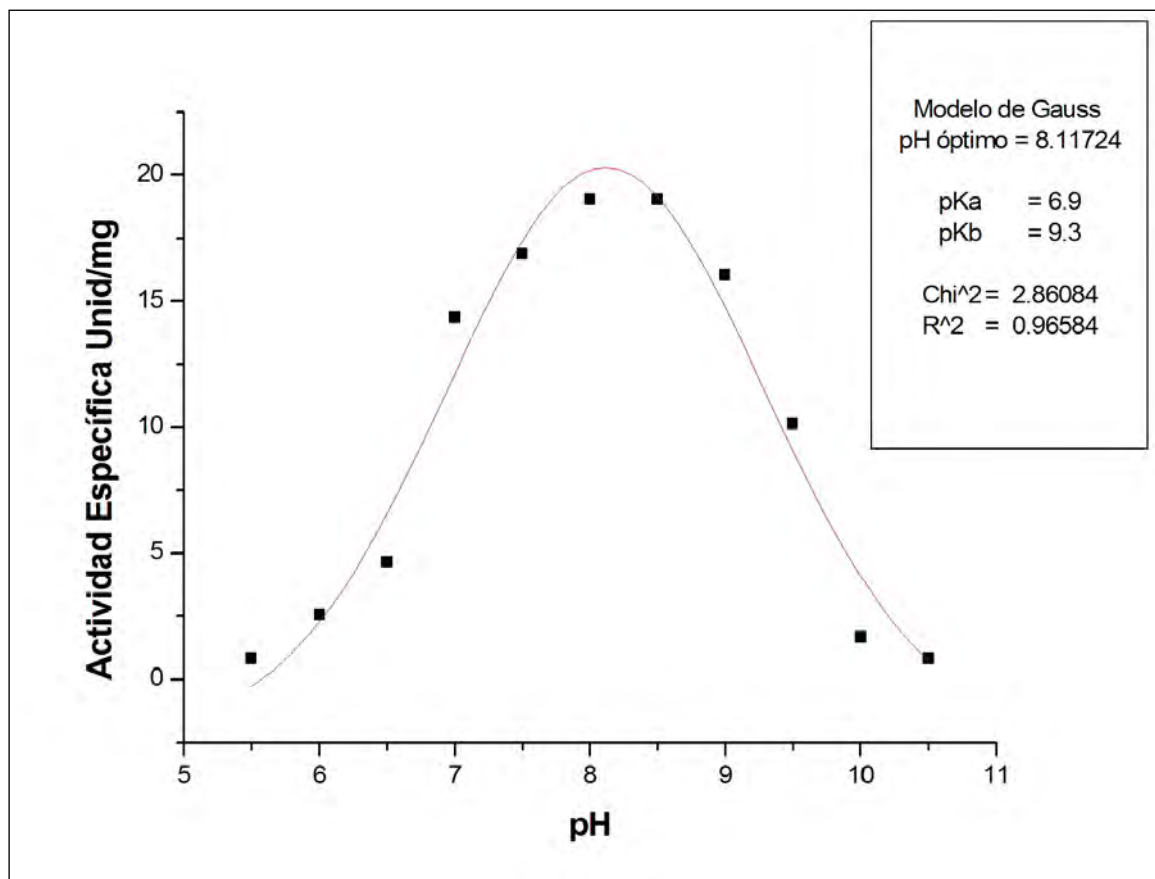


Figura N° 16 Determinación del pH óptimo de actividad de la L-aminoácido oxidasa del veneno de *Bothrops atrox* sobre L-metionina (7,5 mM).

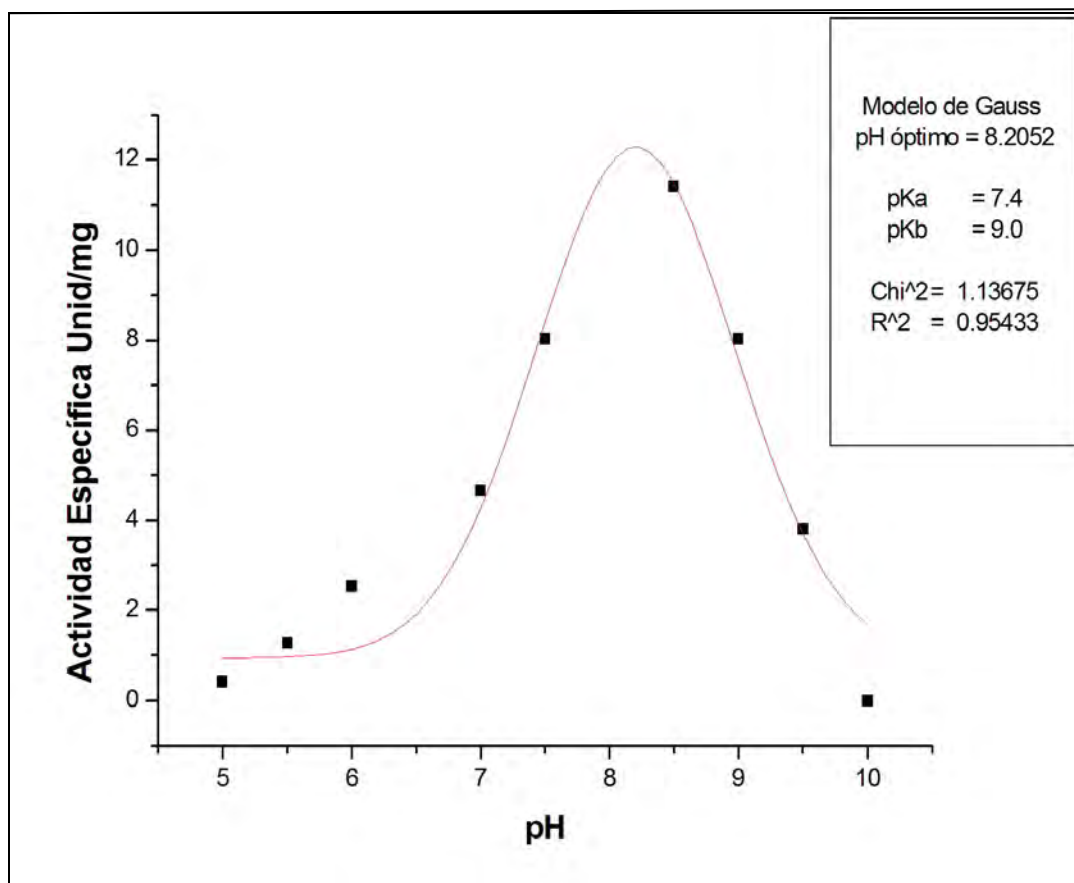


Figura N° 17 Determinación del pH óptimo de actividad de la L-aminoácido oxidasa del veneno de *Bothrops atrox* sobre L-fenilalanina (7,5 mM).

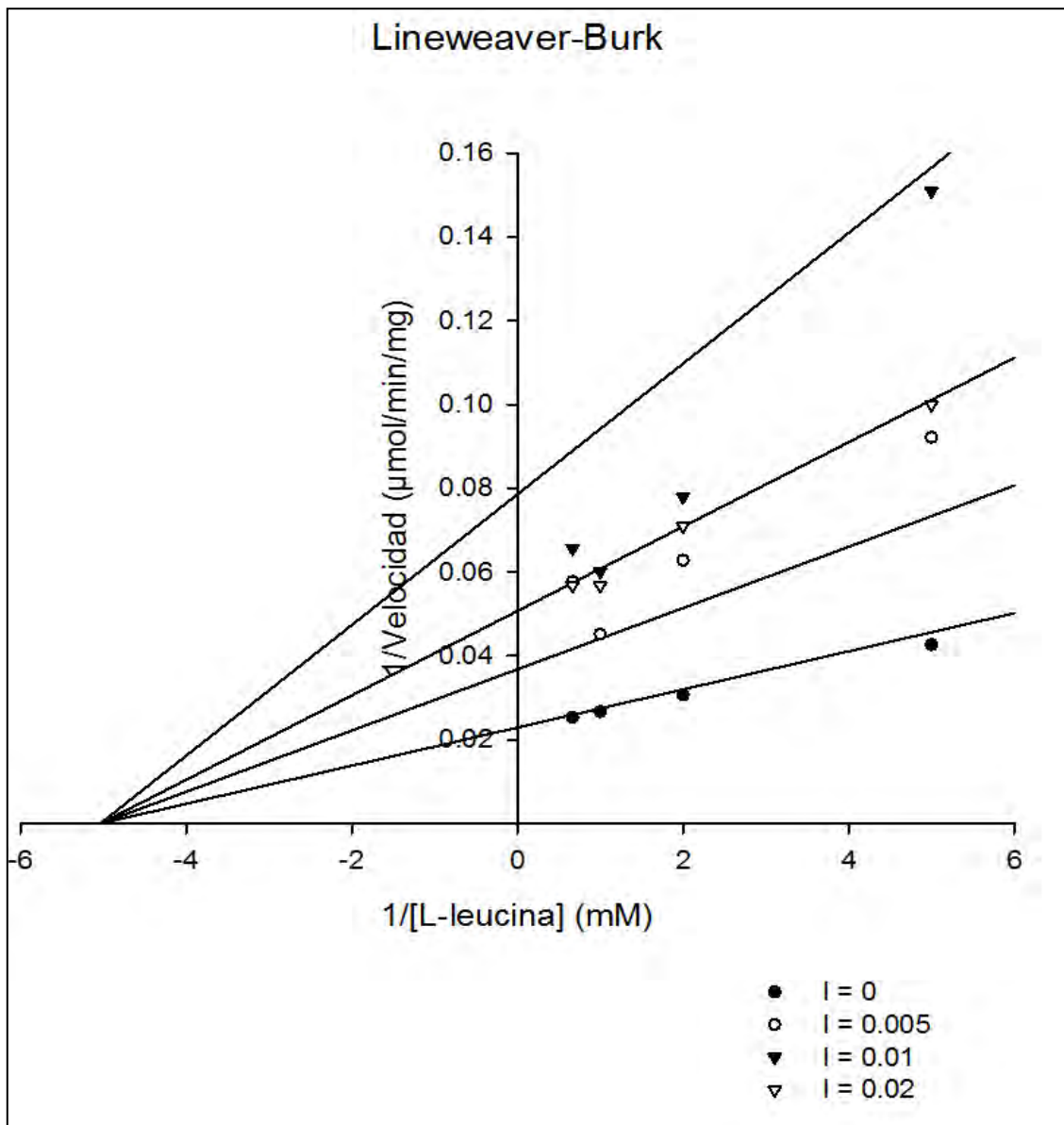


Figura N° 18 Efecto del ácido antranílico 0.005, 0.01 y 0.02 mM sobre la actividad de la L-aminoácido oxidasa de *B. atrox* utilizando L-leucina como sustrato (0.2, 0.5, 1.0 y 1.5 mM). Determinación del K_i mediante la representación de Lineweaver-Burk.

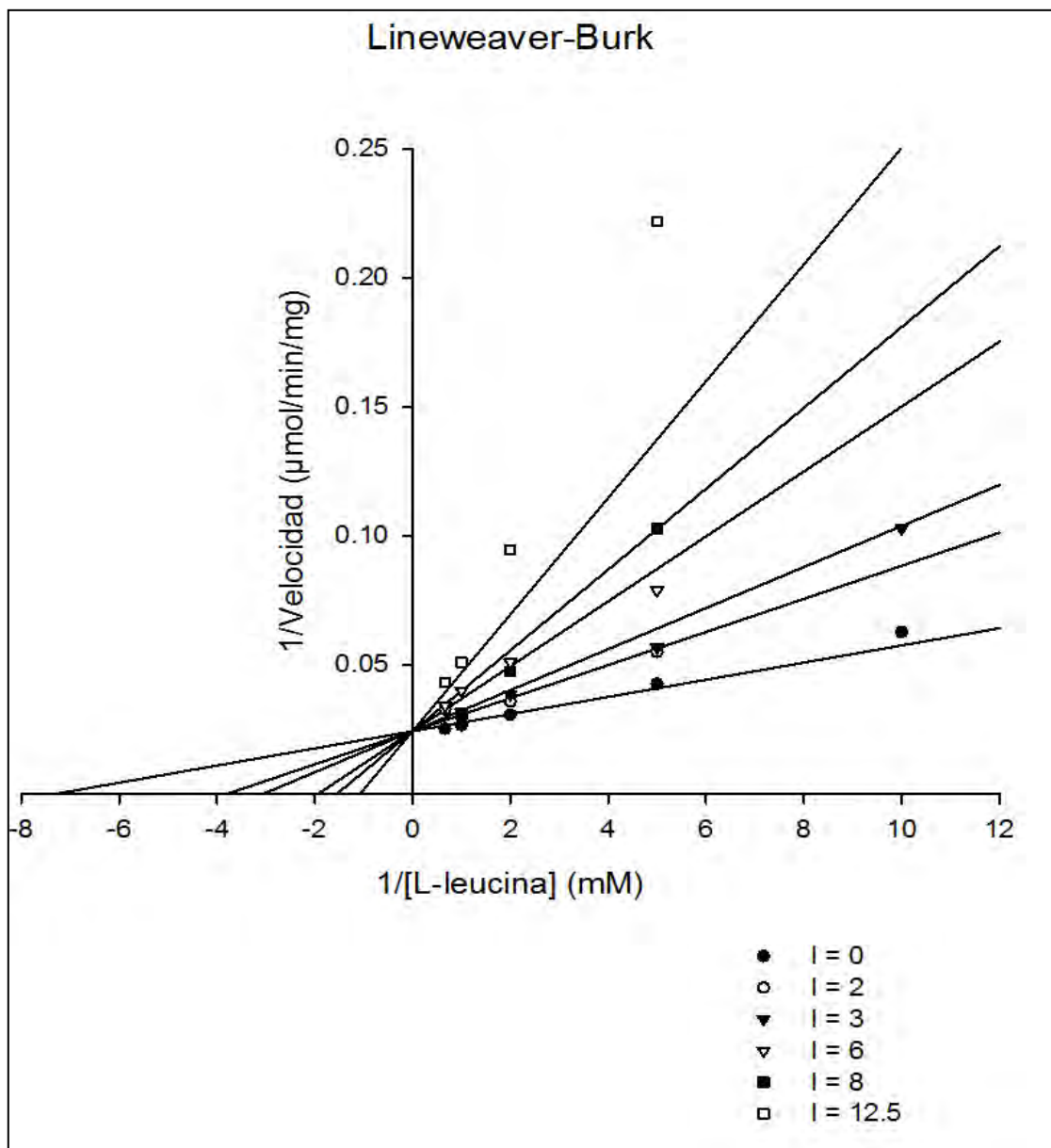


Figura Nº 19 Efecto del ácido benzoico 2, 3, 6, 8 y 12.5mM sobre la actividad de la L-aminoácido oxidasa de *B. atrox* utilizando L-leucina como sustrato (0.2, 0.5, 1.0 y 1.5 mM). Determinación del K_i mediante la representación de Lineweaver-Burk.

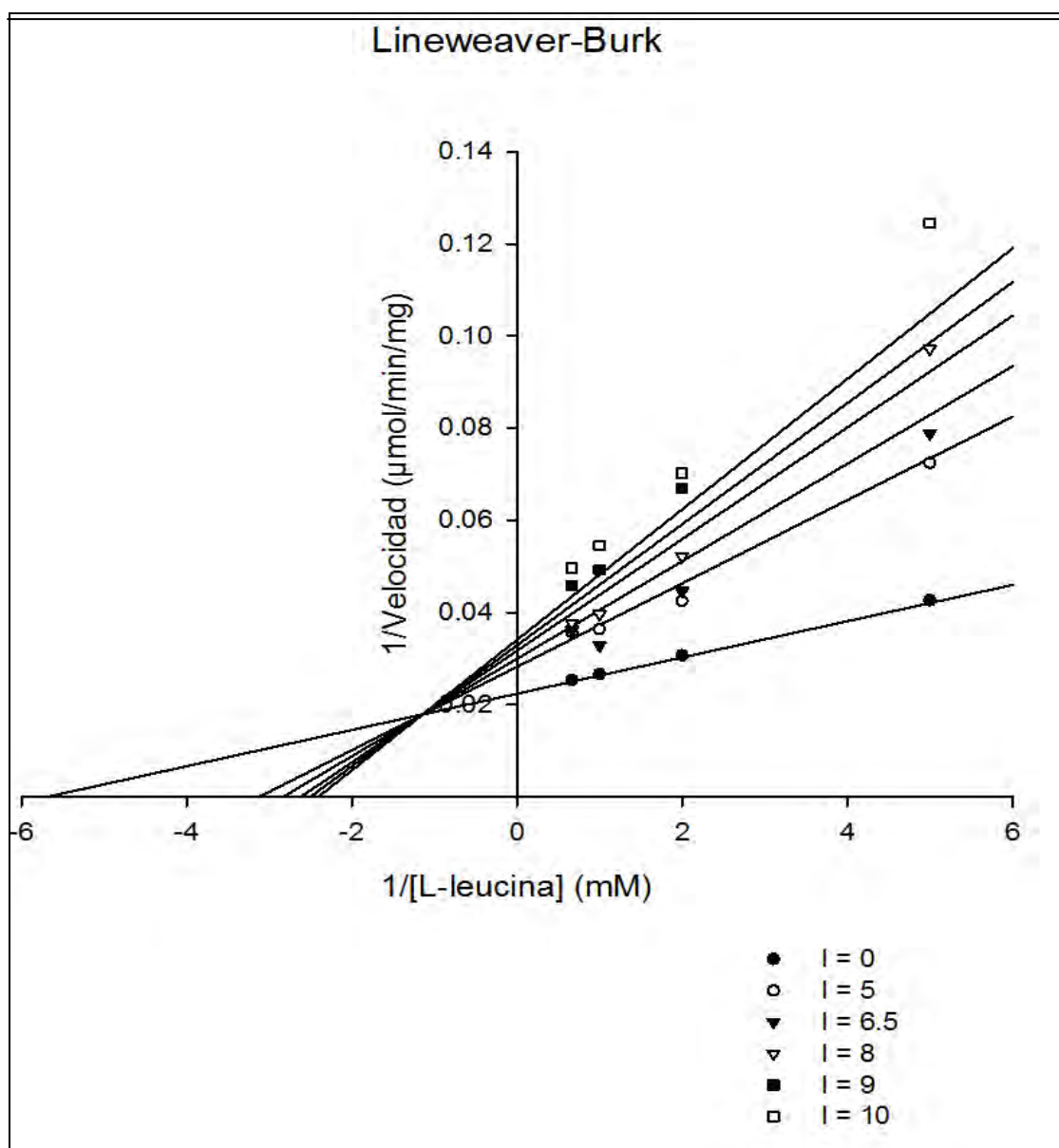


Figura Nº 20 Efecto del ácido sulfanílico 5, 6.5, 8, 9 y 10 sobre la actividad de la L-aminoácido oxidasa de *B. atrox* utilizando L-leucina como sustrato (0.2, 0.5, 1.0 y 1.5 mM). Determinación del K_i mediante la representación de Lineweaver-Burk.

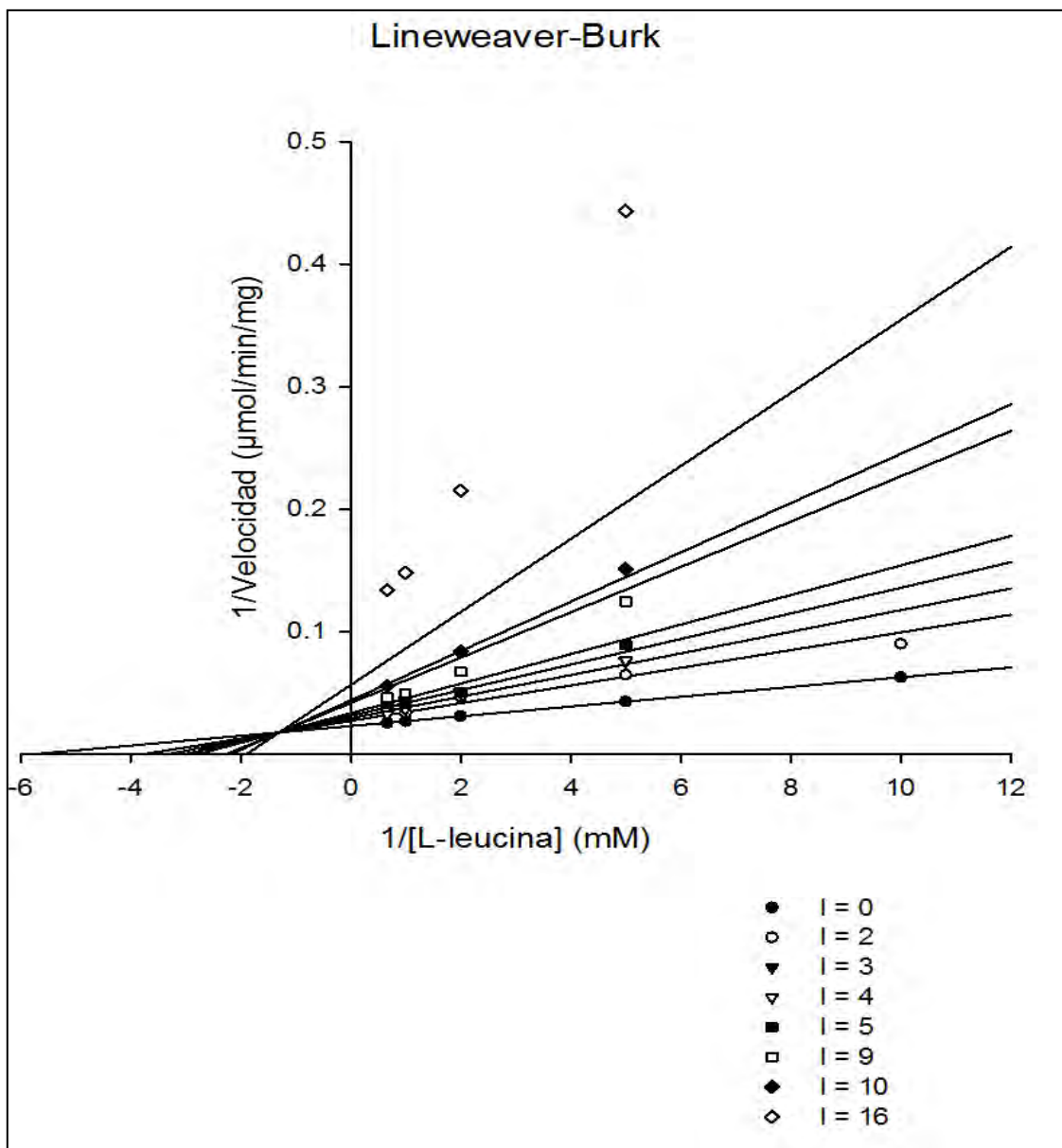


Figura N° 21 Efecto del ácido salicílico 2, 3, 4, 5, 9, 10 y 16 mM sobre la actividad de la L-aminoácido oxidasa de *B. atrox* utilizando L-leucina como sustrato (0.2, 0.5, 1.0 y 1.5 mM). Determinación del K_i mediante la representación de Lineweaver-Burk.

Inhibidor	Concentraciones ensayadas (mM)	K_i (mM)	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol/min/mg}$)	Modelo de inhibición	R^2	Sxy	AICc
ácido antranílico (o-aminobenzoico)	0.005, 0.01 y 0.02	0.008	0.199	43.7	no competitivo	0.843	4.069	53.226
ácido benzoico	2, 3, 6, 8 y 12.5	2.2	0.137	41.1	competitivo	0.931	2.582	52.435
ácido sulfanílico (p-aminobenzenosulfónico)	5, 6.5, 8, 9 y 10	3.8	0.176	44.7	mixto total	0.945	2.155	45.814
ácido salicílico (o-hidroxibenzoico)	2, 3, 4, 5, 9, 10 y 16	4.5	0.175	43.9	mixto total	0.923	2.737	72.479

Tabla Nº 5 Determinación del modelo de inhibición y valor de K_i para los ácidos antranílico, benzoico, sulfanílico y salicílico utilizando L-leucina como sustrato.

